

SÉRGIO ARTHURO MOTA ROLIM

**O DÉFICIT DE MEMÓRIA EM RATOS PRIVADOS DE SONO É PREVENIDO  
PELA INTERAÇÃO DOS COMPONENTES HOMEOSTÁTICO E  
CIRCADIANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina,  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências.

São Paulo

2007

Rolim, Sérgio Arthuro Mota

**O déficit de memória em ratos privados de sono é prevenido pela interação dos componentes homeostático e circadiano.** /Sérgio Arthuro Mota Rolim. -- São Paulo, 2007.

x, 66f

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Psicobiologia.

Título em inglês: The memory deficit in sleep-deprived rats is prevented by interaction of the homeostatic and circadian components.

1. Privação do sono. 2. Memória. 3. Ritmo circadiano. 4. Homeostase. 5. Aprendizagem da esquiva.

SÉRGIO ARTHURO MOTA ROLIM

**O DÉFICIT DE MEMÓRIA EM RATOS PRIVADOS DE SONO É PREVENIDO  
PELA INTERAÇÃO DOS COMPONENTES HOMEOSTÁTICO E  
CIRCADIANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo - Escola Paulista de Medicina,  
para obtenção do Título de Mestre em  
Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Hipólide

Co-orientador: Prof. Dr. John Fontenele Araújo

São Paulo  
2007

Esta tese foi realizada no Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, com o apoio financeiro da Associação Fundo de Incentivo a Psicofarmacologia (AFIP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), dos Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão (CEPID – processo 98/14303-3), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - processo 05/52045-1).

De onde ela vem?! De que matéria bruta  
Vem essa luz que sobre as nebulosas  
Cai de incógnitas criptas misteriosas  
Como as estalactites duma gruta?!

Vem da psicogenética e alta luta  
Do feixe de moléculas nervosas,  
Que, em desintegrações maravilhosas,  
Delibera, e depois, quer e executa!

Vem do encéfalo absconso que a constribe,  
Chega em seguida às cordas do laringe,  
Tísica, tênue, mínima, raquítica ...

Quebra a força centrípeta que a amarra,  
Mas, de repente, e quase morta, esbarra  
No mulambo da língua parálitica

A idéia – Augusto dos Anjos

*Aos meus pais,  
Jerônimo (painho) e Lucemere (mainha)  
e à minha família e amigos,  
Amo muito todos vocês!*

## **Agradecimentos**

À minha orientadora Débora, também conhecida por D, pelo carinho com que me recebeu em seu laboratório e pela paciência em lidar com um nordestino que não conseguiu absorver o ritmo acelerado de Sampa.

Ao meu orientador John, mestre e amigo de longa data, por todos os conhecimentos científicos e filosóficos que levarei sempre comigo esteja onde estiver.

À professora Gabi, parceira científica e musical, pelos conhecimentos transmitidos (agora tenho certeza que estudar memória não melhora a memória...) e pelos ensaios e tocadass no PsicoTrio!

Aos meus amigos e colaboradores Francisco Dubiela, Karin e Paulinha, por me ajudarem tanto nesse trabalho... serei grato por toda minha vida!

À pessoa mais sábia que tive a honra de conhecer e conviver, o grão-mestre Orlando, pelas aulas de filosofia da ciência e por todas as sessões de discussão filosófica pós-aula...

Ao meu xará e chefe Sergio Tufik, pela simpatia e bom humor nas reuniões do grupo de sono.

Ao grande Dunga, que me ensinou e me ajudou a operar os animais, sem o qual não conseguiria realizar os experimentos.

Aos colegas de trabalho Tati, Danilo, Eduardo, Francisco Godoy, Mariana (parceira musical), Cláudio, Raquel, Juliana, Jair, Nadine, Karina, Andrezza, Bruna, Susy, Perla, Julien, Shirley, Adriana, Lúcio, Léo, Priscila, Fúlvio, Bel, Alberto, Bia, Cláudia, Andréia, Márcio, Camila e Ricardo, pela convivência, amizade e pelas baladas na noite paulista.

Aos professores Mario, Deborah e Laura, pelos ensinamentos e pela amizade cultivada durante todo esse tempo.

À Cris, pela simpatia e disposição que sempre me recebe na biblioteca, e também pela paciência com os livros atrasados.

Aos funcionários do departamento Tomé e Marilde, pela ajuda e orientação nos laboratórios e no biotério, e à Selminha, pelo cafezinho nos fins de semana e pela persistente tentativa de organizar minha sala sempre bagunçada.

Ao pessoal da secretaria, Nereide, Marcio, Júlio, Valéria e Andréia, sempre muito dispostos a me ajudar com os trâmites burocráticos do mestrado.

Aos amigos de Natal que também vieram para essa cidade, Tiago “Lambiôia”, Tiago “Timbu”, Sérvulo, Lauro, Felipe, Mario “Bacana”, Daniel, Marcelinho, Rodrigo, Márcio, Marcelo “Susy” e Gustavo, pelos momentos nostálgicos e inesquecíveis...

Aos meus amigos do IINN, Nelson, Cris, Natália, Rafael, Serginho, André, Marcos, Adriana, Nivaldo e Hindiael pelo companheirismo, e especialmente Sidarta, por sonhar e colocar em prática a ciência também como meio de transformação social!

Ao meu vizinho de flat e de estado Dr. Valério, pela amizade sincera e presente em todos os momentos.

Aos ratinhos, sem os quais esse trabalho nunca seria realizado, meu profundo respeito e gratidão.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio para realização desse trabalho.



## RESUMO

Várias evidências na literatura demonstram que a privação de sono (PS) produz prejuízo no desempenho em tarefas de memória dependentes da função hipocampal, como a esQUIVA INIBITÓRIA (EI). Entretanto, os mecanismos responsáveis por esses efeitos não estão completamente esclarecidos. No presente estudo, avaliamos a relação dos mecanismos homeostáticos (aumento na duração do sono após a privação de sono) e circadianos (propensão para se iniciar o sono em períodos próximos de 24 horas), no déficit de memória pela privação de sono. Para isso, ratos Wistar foram treinados na tarefa de EI em diferentes horários do dia (08:00h, 14:00h, 20:00h e 02:00h), com o objetivo de se verificar o desempenho dos ratos nessa tarefa em função do horário do dia (experimento 1). Em outro experimento, os animais foram privados de sono por 96 horas pelo método da plataforma múltipla modificado, com início do procedimento de PS às 08:00h, 14:00h, 20:00h ou 02:00h. Imediatamente ao final da PS, os animais foram treinados na EI (experimento 2) ou tiveram a oportunidade de dormir por um período de 12 horas (janela de sono, JS) seguido pelo treino na EI (experimento 3). Nesse terceiro experimento, a JS ocorreu predominantemente durante as fases clara ou escura, ou dividido nessas duas fases. A sessão de teste nessa tarefa foi dividida em teste 1 (1 hora após o treino) e teste 2 (24 horas após o treino). Os resultados do experimento 1 mostram que o desempenho dos ratos na EI não foi diferente em relação ao horário do dia em que foram treinados. Além disso, observamos que os animais privados de sono apresentaram prejuízo significativo no desempenho na sessão de teste da EI quando comparados ao grupo controle nos diferentes horários do dia (experimento 2). No experimento 3, somente os animais privados de sono e que tiveram a JS durante a fase clara apresentaram uma recuperação do prejuízo no desempenho da EI, quando comparados ao grupo controle. Com o intuito de avaliar a arquitetura do sono durante as 12 horas de JS, realizamos o registro polissonográfico dos animais, quando a JS ocorre predominantemente nas fases clara ou escura (experimento 4). Nesse último experimento, observamos um aumento da quantidade de sono paradoxal quando comparamos a JS de 12 horas após a PS (tanto na fase clara como na fase escura) com a condição basal.

Entretanto, quando comparamos os parâmetros de sono nas 12 horas de JS na fase clara com a fase escura, observamos uma maior eficiência de sono e menor número despertares. Esses resultados sugerem que o componente circadiano continua atuando durante a JS, já que essa é diferente conforme a fase circadiana em que acontece. Estes resultados indicam que a coincidência entre os componentes homeostáticos e circadianos, ou seja, a ocorrência de uma JS de 12 horas durante a fase clara (fase de repouso do rato), permitiu um rebote de sono mais robusto e organizado, o que poderia influenciar positivamente a aprendizagem e a memória em ratos privados de sono.

## ABSTRACT

Several studies have shown that sleep deprivation (SD) produces deficits in the performance of hippocampus-dependent learning tasks, as inhibitory avoidance (IA). However, the mechanisms underlying these effects are not completely understood. In this study, we investigated the relationship of the homeostatic (increasing in sleep duration after sleep deprivation) and circadian mechanisms (tendency to start sleep in periods around 24 hours) in memory deficits induced by SD. To do this, male Wistar rats were trained in the IA task in four different times of the day (08:00h, 14:00h, 20:00h or 02:00h) with the purpose to verify if the performance of rats in this task depends on the time of the day (experiment 1). In another experiment, the animals were sleep-deprived for 96 hours using the modified multiple platform method. SD procedure started and finished in four different times of the day: 08:00h, 14:00h, 20:00h, or 02:00h. Immediately after SD, animals were then trained in an IA task (experiment 2), or allowed to sleep 12 hours (sleep window, SW) before IA training (experiment 3). In this third experiment, SW happened predominantly during light phase or dark phase, or divided between them. Two test sessions in this task were performed: 1 hour (test 1) and 24 hours (test 2) after training session. The results of experiment 1 showed that rat's performance in IA was not different in the four times of the day tested. In experiment 2, sleep-deprived rats showed significant impairment in IA performance, when compared to control group, in all four times of the day tested. In experiment 3, only the sleep-deprived rats that had SW during light phase (which is also the resting phase of these animals) did not show significant impairment in IA performance when compared to control group. With the purpose to investigate sleep architecture during the 12 hours of SW, we realized polysomnographic recordings when SW happens predominantly during light or dark phases (experiment 4). In this last experiment, we found an increasing in paradoxical sleep when we compare the 12 hours of SW (such in light phase as in dark phase) with basal (before SD) condition. However, when we compare sleep parameters of SW in the light phase with SW in the dark phase, we found a greater sleep efficiency and a fewer number of awakenings in SW during light phase. This result suggests that the circadian mechanism is still acting during SW, because it is different

according to the circadian phase it happens. Our results also indicate that the coincidence between homeostatic and circadian mechanisms (SW during resting phase) allowed a more robust and organized sleep rebound, which could influence positively learning and memory of sleep-deprived rats.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 O sono e a sua contribuição para a memória .....</b>	<b>2</b>
<b>1.2 A privação de sono e o déficit de memória .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 O modelo dos dois processos .....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Animais .....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 Privação de sono .....</b>	<b>18</b>
<b>3.3 Aparato para a avaliação da memória .....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Polissonografia .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.1 Cirurgia .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.2 Aparato de registro de sono .....</b>	<b>23</b>
<b>3.5 Desenho Experimental .....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.1 Experimento 1 - Avaliação do componente circadiano no desempenho da EI .....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.2 Experimento 2 - Avaliação do desempenho na EI após privação de sono por 96 horas em diferentes horários do dia .....</b>	<b>25</b>
<b>3.5.3 Experimento 3 - Avaliação do desempenho na EI após privação de sono por 96 horas e janela de sono de 12 horas em diferentes horários do dia .....</b>	<b>26</b>
<b>3.5.4 Experimento 4 – Registro polissonográfico da janela de sono de 12 horas nas fases clara e escura .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6 Análise estatística .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6.1 Esquiva inibitória .....</b>	<b>27</b>
<b>3.6.2 Registro de sono .....</b>	<b>28</b>
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Experimento 1 - Avaliação do componente circadiano no desempenho da EI .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Experimento 2 - Avaliação do desempenho na EI após privação de sono por 96 horas em diferentes horários do dia .....</b>	<b>29</b>
<b>4.2.1 Animais treinados na EI às 08:00h .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2 Animais treinados na EI às 14:00h .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.3 Animais treinados na EI às 20:00h .....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.4 Animais treinados na EI às 02:00h .....</b>	<b>31</b>
<b>4.3 Experimento 3 - Avaliação do desempenho na EI após privação de sono por 96 horas e janela de sono de 12 horas em diferentes horários do dia .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.1 Animais treinados na EI às 08:00h .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.2 Animais treinados na EI às 14:00h .....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.3 Animais treinados na EI às 20:00h .....</b>	<b>35</b>
<b>4.3.4 Animais treinados na EI às 02:00h .....</b>	<b>35</b>
<b>4.4 Experimento 4 – Registro polissonográfico da janela de sono de 12 horas nas fases clara e escura .....</b>	<b>38</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa .....</b>	<b>66</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

Nas sociedades modernas (com o advento da luz elétrica), principalmente no meio urbano (com a popularização dos televisores e computadores), as pessoas vêm dormindo em média cada vez menos. A privação de sono é um dos problemas de saúde pública mais comuns e menos reconhecidos. Como consequência, essas pessoas acabam por diminuir a qualidade das suas atividades na escola e no trabalho, aumentando ainda mais o tempo dedicado a estes, na tentativa de compensação. Assim, entram num ciclo de privação de sono que resulta em prejuízo nas funções cognitivas como a aprendizagem e memória, diminuição da atenção, alterações do humor, além de estresse (Bonnet & Arand, 1995). A influência da perda de sono na aprendizagem e na memória será o foco do presente trabalho. Inicialmente, apresentaremos uma breve revisão da literatura sobre: ❶ as observações das mudanças no sono após tarefas de aprendizagem, e como isso pode ter relação com a consolidação das memórias durante o sono, além ❷ da importância da abordagem de privação de sono e suas consequências na memória. Posteriormente, serão discutidos ❸ os mecanismos de regulação do sono, relacionados aos processos homeostáticos e circadianos, e para finalizar, como estes mecanismos podem influenciar o déficit de memória secundário a privação, objeto de avaliação deste estudo.

### ***1.1 O sono e a sua contribuição para a memória***

Vários estudos têm demonstrado a relação do sono com os processos cognitivos, entre eles, a memória. Ambrosini e colaboradores (1992) observaram que ratos apresentam um aumento na duração do estágio de sono

REM após serem submetidos a tarefas de aprendizagem. A mudança na arquitetura do sono após uma tarefa de aprendizagem mostra uma forte relação com o desempenho inicial durante a aquisição das informações. Os animais que aprendem mais têm grande mudança na arquitetura, enquanto que aqueles que aprendem menos mostram relativamente pouca alteração (Ambrosini, Langella, Gironi Carnevale, & Giuditta, 1992). Datta (2000) sugeriu que, para pelo menos algumas formas de aprendizado, as ondas P em ratos (equivalentes às ondas ponto-genículo-occipitais ou PGO em humanos) que acontecem durante o sono paradoxal se relacionam com os mecanismos fisiológicos da consolidação da memória: após um treino inicial numa tarefa de memória, tanto a quantidade de sono paradoxal, quanto à densidade de ondas P, aumentaram drasticamente, e esse aumento tem relação com o grau de retenção das informações adquiridas antes do sono.

Da mesma forma que ocorre com outros animais, o sono em humanos muda quando os mesmos são submetidos a tarefas de aprendizagem. De Koninck e colaboradores demonstraram um aumento significativo no sono REM após o aprendizado intensivo de uma língua estrangeira, sendo o grau de sucesso no aprendizado relacionado com o grau de aumento no sono REM (De Koninck et al., 1989). Além disso, encontrou-se também aumento do sono REM após o treino numa tarefa de procedimento, onde se avalia a memória implícita (Smith, Nixon, & Nader, 2004). Esses achados sugerem que o sono REM tem papel ativo na consolidação da memória, e que o aumento do sono REM após o treino (tanto em animais como em humanos) reflete uma resposta para uma demanda aumentada para tal consolidação (Walker & Stickgold, 2006).

Evidências de melhora na memória e aprendizagem após o sono têm sido encontradas, através de uma variedade de paradigmas comportamentais, em várias espécies de animais além do homem, como outros primatas, gatos e roedores (Peigneux, Laureys, Delbeuck, & Maquet, 2001; Smith, 2001). Entretanto, os estudos baseados somente em observação comportamental se limitam quanto à elucidação da neurobiologia que rege o sono e a memória. Assim, outras abordagens como os estudos de lesão, neuroimagem e eletrofisiologia têm auxiliado na compreensão das estruturas que participam mais efetivamente do sono e da memória, para depois tentar entender como estas estruturas interagem entre si (Walker & Stickgold, 2004).

Dessa forma, as estruturas cerebrais que se relacionam com a memória foram inicialmente compreendidas, principalmente, através dos estudos de lesão. Esse método contribuiu também para esclarecer a relação anatômica da memória com o sono, como será descrito posteriormente. Os resultados desses estudos enfatizam a importância crítica de estruturas do lobo temporal medial, destacando-se o hipocampo (O'Keef & Nadel, 1978), no processo de consolidação da memória. A lesão bilateral do hipocampo acarreta em diminuição da memória, sendo este prejuízo observado em tarefas aversivas como a esQUIVA inibitória e o condicionamento clássico ao contexto (Gray, 1982), tarefas estas conhecidas como dependentes da integridade do hipocampo. Além disso, o tipo de memória prejudicada é proporcional ao tamanho da lesão: pequenas lesões acarretam em perda da memória espacial, enquanto que lesões mais extensas, por todo o hipocampo, têm como resultado déficit na memória relacionada ao reconhecimento de objetos (Broadbent, Squire, & Clark, 2004).



A relação entre o hipocampo e o sono REM, dessa forma, torna-se mais clara com os estudos de imagem funcional do cérebro durante o sono. Estes estudos têm demonstrado que há um aumento da atividade do córtex parahipocampal durante o sono REM (Hobson, Pace-Schott, & Stickgold, 2000). Maquet e colaboradores demonstraram uma ativação de padrões neuronais, elucidados durante a prática de uma série de tarefas envolvendo o aprendizado de habilidades motoras, antes do sono. Este mesmo padrão reaparece durante os episódios subseqüentes de sono REM (Maquet et al., 2000). Essa reativação neural no sono, após tarefas de aprendizado, pode permitir o aumento na força sináptica de redes específicas, contribuindo assim para a consolidação da memória (Walker & Stickgold, 2004). Além disso, o mapeamento por imagem cerebral durante o sono, também tem esclarecido o fenômeno de plasticidade cerebral dependente de sono. Os estudos de neuroimagem, concomitantemente a tarefas de aprendizagem, confirmam que esse fenômeno de plasticidade aumenta durante o sono. Maquet e colaboradores demonstraram essa propriedade usando tarefa visuomotora, em combinação com Ressonância Magnética Funcional. Os sujeitos controle, que não foram submetidos a nenhum treinamento durante o dia, não apresentaram esse padrão de atividade (Maquet, Schwartz, Passingham & Frith, 2003).

Os métodos eletrofisiológicos têm confirmado e esclarecido os resultados encontrados nos estudos de imagem funcional descritos acima. A presença de ondas teta, vistas no hipocampo durante o sono REM em humanos (Cantero et al., 2003), bem como em outros animais (Poe, Nitz, McNaughton, & Barnes, 2000), facilita a indução de LTP (do inglês, Long-Term Potentiation ou Potenciação a Longo-Prazo), sendo este fenômeno relacionado

aos mecanismos neurobiológicos de formação da memória. Estes resultados, como um todo, sugerem então que o sono teria papel fundamental na consolidação da memória, e que isto é essencialmente dependente da atividade do hipocampo.

### ***1.2 A privação de sono e o déficit de memória***

A abordagem envolvendo privação de sono tem sido muito utilizada para estudar a relação do sono com a consolidação da memória (Bonnet & Arand, 1995). Entretanto, alguns autores criticam esse método, principalmente pela falha no controle dos efeitos gerais da privação de sono no desempenho cognitivo, como a diminuição do alerta e da atenção, bem como os efeitos associados ao estresse, atribuído tanto à perda de sono quanto aos métodos que utilizam privação de sono (Siegel, 2001; Vertes, 2004). Todavia, trabalhos recentes, tanto em humanos como em outros animais, têm demonstrado que a diminuição no desempenho pode ainda ser visto vários dias após a privação de sono, quando o alerta e a atenção já têm retornado ao normal (Smith & Smith, 2003). Além disso, num artigo publicado recentemente, foi observado que a privação de sono durante uma única noite, em humanos, diminui a atividade hipocampal durante a aquisição de memórias episódicas, resultando numa retenção posterior prejudicada (Yoo, Hu, Gujar, Jolesz, & Walker, 2007).

A privação total, bem como a privação seletiva de sono REM, em humanos, influencia a memória não declarativa (Karni, Tanne, Rubenstein, Askenasy, & Sagi, 1994; Smith, 2001; Walker & Stickgold, 2004), produzindo efeitos deletérios em tarefas de procedimento e motoras. Com relação à memória declarativa, estudos de privação de sono têm demonstrado resultados

distintos, aos quais parece estar associada à complexidade da tarefa aprendida (Walker & Stickgold, 2004). Além disso, o caráter emocional que o sujeito experimenta, durante a realização dos testes para avaliar sua memória, pode influenciar fortemente o grau de dependência dessa memória com o sono (Wagner, Gais, & Born, 2001). Mesmo assim, indivíduos que realizam testes simples de memória apresentam melhores resultados quando no intervalo entre os testes os sujeitos dormem, em comparação com os sujeitos que não dormem (Wagner, Gais, Haider, Verleger, & Born, 2004). Os mecanismos neurobiológicos que poderiam explicar essa relação não estão completamente esclarecidos, porém tem-se demonstrado que o sono REM promove um estado cerebral em que o acesso a associações fracas é seletivamente facilitado (Stickgold, Scott, Rittenhouse, & Hobson, 1999).

As evidências experimentais também têm demonstrado que há um claro prejuízo na memória e na aprendizagem quando o animal é privado de sono. A memória, no entanto, não se apresenta globalmente prejudicada, mas apenas em algumas das suas formas de expressão. Os animais privados de sono paradoxal apresentam prejuízo na memória de reconhecimento espacial, o que pode ser observado, por exemplo, através do desempenho num labirinto, onde o animal precisa reconhecer relações espaciais entre os objetos do ambiente para se orientar (Youngblood, Zhou, Smagin, Ryan, & Harris, 1997). Além disso, animais submetidos à tarefa de discriminação visual, onde estes aprendem a reconhecer pistas visuais para obter a recompensa, apresentam melhor resultado quando podem dormir entre o treino e o teste (Stickgold, James, & Hobson, 2000). Estudos em nosso laboratório com privação de sono, em ratos, têm demonstrado que os mesmos apresentam prejuízo na memória

relacionada a tarefas aversivas como esquivas inibitórias, condicionamento clássico ao contexto e a estímulos sonoros (Bueno et al., 1994; Dametto et al., 2002).

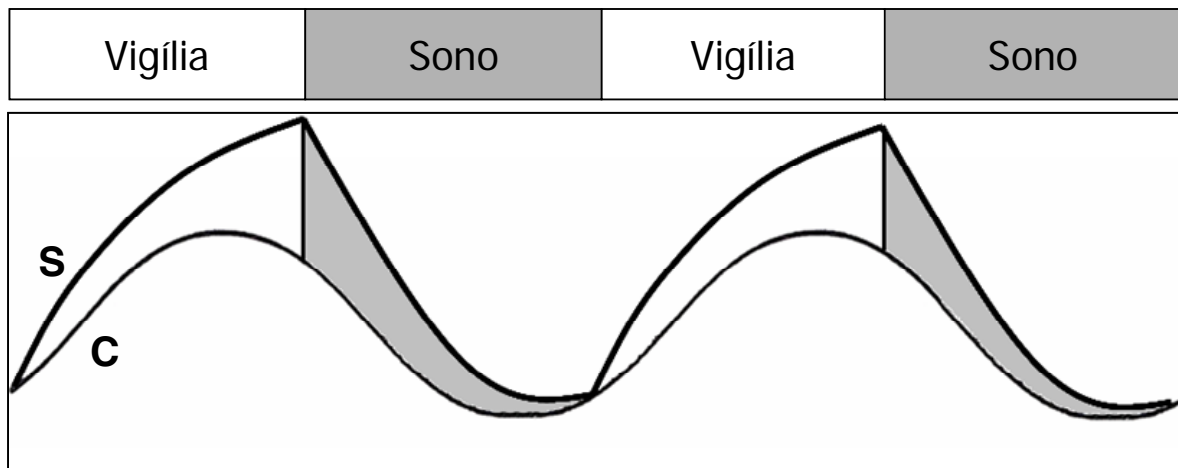
A busca por mecanismos envolvidos nos efeitos deletérios da privação de sono sobre a memória apresenta diversas abordagens: a privação de sono prejudica a indução de potenciação a longo prazo (LTP) entre neurônios hipocámpais de ratos (Campbell, Guinan, & Horowitz, 2002; McDermott et al., 2003; Davis, Harding, & Wright, 2003). Silva e colaboradores observaram que a privação de sono induz um aumento no estresse oxidativo no hipocampo em paralelo a um prejuízo do desempenho de camundongos na tarefa de esquivas inibitórias. Neste mesmo estudo, observaram também que a administração crônica de anti-oxidantes pode reverter o aumento no estresse oxidativo hipocámpal e os efeitos deletérios sobre a esquivas inibitórias após a privação de sono (Silva et al., 2004). Outro trabalho demonstrou que ratos privados de sono por 6h apresentam níveis reduzidos de proteínas associadas à plasticidade neuronal no hipocampo, e que esse efeito pode ser revertido após 2h de recuperação de sono (Guan, Peng, & Fang, 2004). Uma abordagem que também pode auxiliar na compreensão da relação entre privação de sono e déficit de memória é através dos estudos envolvendo os sistemas de neurotransmissão. Os mecanismos colinérgicos foram estudados inicialmente, visto que a participação da acetilcolina é bem estabelecida nos processos de modulação (indução e manutenção) do sono REM (Hobson, Datta, Calvo, & Quattrochi, 1993). Em nosso laboratório, observamos que o prejuízo da privação de sono por 96h sobre o desempenho na esquivas inibitórias pode ser revertido com o tratamento crônico de pilocarpina, um agonista colinérgico,

durante o período de privação (Bueno et al., 2000). Entretanto os déficits de memória e aprendizado, após privação de sono, não podem ser atribuídos aos receptores muscarínicos tipo M1, pois não há alteração na marcação dos mesmos (Moreira et al., 2003). A modulação envolvendo o GABA foi então aventada para explicar esse mecanismo, visto que uso de benzodiazepínicos (agonistas GABAérgicos) provoca prejuízo na memória em humanos e outros animais. Entretanto, estudos com ensaio auto-radiográfico e análise densitométrica, também em nosso laboratório, não mostraram relação entre o receptor GABA tipo A e os déficits de memória associados à privação de sono (Dubiel et al., 2005).

Outra abordagem pouco estudada envolve os mecanismos fisiológicos que regem os processos reguladores do sono. Estes mecanismos se baseiam no modelo de regulação do ciclo sono-vigília que é composto por dois componentes principais (Borbély & Achermann, 1999). Estes processos são responsáveis pelas características homeostáticas e circadianas do sono e da memória, como será descrito a seguir.

### ***1.3 O modelo dos dois processos***

O modelo dos dois processos foi formulado por Daan, Beersma e Borbély (1984) (**figura 1**), sendo proposto inicialmente para descrever a regulação do sono em ratos (Borbély, 1980), e posteriormente aplicado para o sono em humanos (Borbély, 1982).



**Figura 1.** Modelo dos dois processos (adaptado de Daan, Beersma e Borbély, 1984).

O modelo dos dois processos combina os processos homeostáticos (S) e circadianos (C), para explicar as variáveis temporais do sono, como início, fim e duração do mesmo (Díez-Noguera & Diambra, 2003). Além da regulação homeostática e circadiana, existe também um controle ultradiano do ciclo sono-vigília, relacionado às alterações que ocorrem dentro do sono, ou seja, o sono REM e sono não-REM (Borbély & Achermann, 1999).

O modelo dos dois processos vem sendo usado para explicar vários fenômenos relacionados ao sono, como a presença de ritmos circadianos no desempenho cognitivo que envolve memória de trabalho (Van Dongen & Dinges, 2000), sendo esse um dos pilares do presente trabalho, e que será mais detalhado posteriormente.

Este modelo foi posteriormente modificado por Akerstedt e Folkard (1995), que introduziram mais um processo, denominado de inércia do sono, ou simplesmente W. Este seria relacionado à diminuição do desempenho cognitivo e sensação de desorientação sentida pelos indivíduos logo depois de acordarem (Dinges, Orne, Evans, & Orne, 1981), influenciando no alerta, bem como na latência e duração do sono. A inércia do sono demora até duas horas

para se dissipar completamente (Jewett et al., 1999). Entretanto, a maioria dos autores prefere relacionar esse processo aos fatores homeostáticos, como se fizesse parte deste (Van Dongen & Dinges, 2000).

O processo S está relacionado, como dito anteriormente, aos mecanismos homeostáticos, entendendo-se como homeostasia todos os processos fisiológicos coordenados que mantêm a maioria dos estados do organismo em equilíbrio (Borbély & Achermann, 2000). Este processo está relacionado à tendência para dormir, que está em aumento constante durante a vigília, e que pode ser sentido quando o indivíduo permanece acordado por algum tempo após sua hora habitual de ir dormir. Esta pressão começa a diminuir quando o indivíduo inicia seu sono, para então voltar a aumentar logo que o mesmo acorda (Van Dongen & Dinges, 2000). Esse processo poderia ser relacionado a uma substância que se acumularia durante a vigília, até atingir um nível máximo para então desencadear o sono. Benington e Heller (1995) acreditam que esta substância poderia ser a adenosina. Outra forma de se tentar entender melhor a influência homeostática no sono é através da relação estreita que este processo tem com uma das fases do sono. Durante um sono normal, o processo S se reflete na quantidade da atividade de ondas lentas durante o sono não-REM. Essa atividade é caracterizada pela densidade espectral de frequências na faixa de 1 a 4 Hz no EEG. Segundo Borbély e Achermann (2000), a atividade de ondas lentas é o indicador da necessidade de sono: há uma relação direta entre essa atividade e a duração da vigília anterior, assim como uma relação de dose-resposta. Isto já foi demonstrado experimentalmente em modelos animais (Deboer & Tobler, 2003).

O processo C representa a oscilação diária relacionada à tendência ao sono e a vigília. A tendência circadiana para a vigília poderia ser experimentada, por exemplo, pelo aumento espontâneo do alerta no início da manhã mesmo após uma noite sem sono (Van Dongen & Dinges, 2000). Outro exemplo da ação deste processo é encontrado na permanência de um ritmo circadiano no desempenho cognitivo, que envolve memória de trabalho, durante 72 horas de privação de sono (Borbély & Achermann, 2000).

Ao contrário do que ocorre com o mecanismo homeostático, as bases neurobiológicas que regem o processo circadiano são relativamente bem conhecidas, e se agrupam no Sistema de Temporização Circadiana (STC). Este sistema possui vias de entrada e de saída, relacionadas direta ou indiretamente com o Núcleo Supraquiasmático (NSQ), mais especificamente na região do hipotálamo (Moore, 1992). Várias evidências têm demonstrado o papel do NSQ nesse sistema, pois: a) o mesmo recebe fibras nervosas provenientes diretamente da retina (trato retino-hipotalâmico) (Moore & Lenn, 1972), b) sua lesão bilateral e completa acarreta em perda da organização temporal circadiana, c) mesmo isolado (tanto *in vivo* quanto *in vitro*) o NSQ continua a disparar de forma rítmica e circadiana autonomicamente (Moore, 2003) e d) o transplante de NSQ fetal no terceiro ventrículo de um animal sem o núcleo acarreta na restauração do ritmo circadiano, com um período igual ao do animal doador (Ralph, Foster, Davis, & Menaker, 1990).

Além de receber informação a partir da retina, outros sistemas se projetam para esse núcleo, como por exemplo, neurônios localizados no tálamo, hipotálamo e tronco encefálico, além de córtex límbico. Os neurônios do NSQ se projetam para prosencéfalo basal, tálamo e hipotálamo, que,



através dos sistemas endócrino e autônomo, é responsável pelo controle de funções relacionadas à manutenção da homeostase do organismo (Moore, 2003).

Como dito anteriormente, o NSQ participa efetivamente da regulação da expressão circadiana do ciclo sono-vigília. Entretanto, embora a lesão do NSQ em ratos provoque a perda da ritmicidade circadiana do ciclo sono-vigília, a quantidade diária de sono e vigília é mantida, sendo esta quantidade o reflexo da preservação dos fatores homeostáticos (Mistlberger, Bergmann, & Rechtschaffen, 1987). Por outro lado, num estudo com lesão do NSQ em macacos (*Saimiri sciureus*), observou-se um aumento no tempo total de sono, diminuição na latência do sono e perda da consolidação do ciclo sono-vigília. Com esses resultados, os autores propuseram o “modelo dos processos oponentes”, em que o NSQ facilita ativamente o início e a manutenção da vigília em oposição à tendência homeostática para o sono durante o dia subjetivo (Edgar, Dement, & Fuller, 1993). Estes resultados sugeriram que os componentes homeostáticos e circadianos da regulação do ciclo sono-vigília poderiam agir de forma independente, sendo esse um conceito básico e original do modelo dos dois processos. No entanto, um possível mecanismo de retro-alimentação do processo S sobre C tem sido notado desde 1984, por Daan e colaboradores. Esses autores apontaram que a agenda do sono e vigília poderia alterar o tempo de exposição à luz e, portanto, afetar a fase do processo circadiano (Daan, Beersma, & Borbély, 1984).

Evidências experimentais neuroanatômicas recentes também têm contribuído para se questionar esse conceito de independência dos processos C e S na regulação do ciclo sono-vigília. Têm-se demonstrado que o núcleo

dorsomedial do hipotálamo, a zona subparaventricular e a área pré-óptica medial são relés de projeções indiretas do NSQ, não somente para núcleos pré-ópticos, mas também para diversos grupos neuronais distribuídos no encéfalo que participam da promoção do estado de vigília (Deurveilher & Semba, 2005). Outros estudos também têm reforçado esse pensamento, como o de Sigworth e Rea (2003), que detectaram que a adenosina (um possível marcador do processo homeostático, como dito anteriormente) poderia agir no NSQ (responsável pelo controle circadiano).

A expressão comportamental da interação entre esses processos pode ser estudada e melhor compreendida através dos experimentos que envolvem protocolos de dessincronização forçada, onde os sujeitos são isolados e submetidos a ciclos claro-escuro diferentes de 24h (como 20h ou 28h). Devido ao fato de os sujeitos não conseguirem sincronizar a um período além do limite de arrastamento, e como o ritmo circadiano em livre-curso dos sujeitos desse estudo tem um período de 24,1h a 24,2h, os episódios de sono ocorrem em diferentes fases circadianas (Czeisler et al., 1999). Assim, os sujeitos experimentam duas influências distintas simultaneamente: a agenda predeterminada de início e fim de sono, ou seja, a duração de sono, que representa o processo homeostático, e um ritmo em livre curso, que representa o processo circadiano. Nesses estudos, verifica-se que a propensão ao sono é maior quando a temperatura corporal é menor, e nessas condições, a qualidade do sono é melhor. Além disso, não apenas o sono se mostrou governado pela interação entre processos circadianos e homeostáticos, mas também as mudanças nos níveis de alerta e desempenho cognitivo

(envolvendo a memória) que ocorrem de forma rítmica e circadiana durante a vigília (Borbély & Achermann, 2000).

Além disso, protocolos que envolvem privação de sono, através da manutenção dos sujeitos acordados num ambiente laboratorial constante, por pelo menos 24h, também evidenciam flutuações circadianas em algumas variáveis fisiológicas e comportamentais. Van Dongen e Dinges (2000) observaram ritmicidade circadiana no desempenho cognitivo (envolvendo memória) e vigilância psicomotora, estando essas variáveis em relação de fase com a temperatura corporal. Outro estudo, também com seres humanos, observou que alguns indivíduos, mantidos em laboratório por um mês e submetidos a um dia artificial de 24,6 horas, não conseguem sincronizar o ciclo sono-vigília com o tempo circadiano interno. Nesses sujeitos, encontram-se altos níveis de melatonina (hormônio indutor de sono) durante a fase de vigília, ao contrário dos indivíduos que conseguem sincronizar com o dia artificial, que apresentam níveis de melatonina maiores durante o sono. Além disso, foi observado também que nesses últimos sujeitos, o desempenho cognitivo apresenta melhora, ao contrário dos indivíduos que não sincronizam (Wright Jr., Hull, Hughes, Ronda, & Czeisler, 2006).

Em animais, três evidências apontam para uma regulação circadiana na memória (Chaudhury & Colwell, 2002): a) presença de picos no aprendizado em intervalos de 24h após o treino (Holloway & Wansley, 1973), b) estudos de lesão no NSQ e perda da expressão rítmica em tarefas de aprendizado (Stephan & Kovacevic, 1978) e c) prejuízo em tarefas envolvendo memória espacial, quando submetidos à dessincronização forçada, através de mudança rápida no ciclo claro-escuro (Devan et al., 2001). Entretanto, poucos estudos

com animais de laboratório (principalmente nos animais de sono polifásico) relacionam essas características rítmicas da memória com o sono, ou mais especificamente com a privação de sono, sendo esse o objetivo do presente trabalho.

## **2. OBJETIVO**

O objetivo geral do presente estudo foi identificar as influências dos componentes homeostático e circadiano sobre o déficit de aprendizagem e memória na esQUIVA inibitória, observado em ratos privados de sono por 96 horas.

A hipótese do nosso estudo baseia-se na idéia de que o déficit de memória devido à privação de sono seja decorrente do aumento da pressão da propensão ao sono (influência do componente homeostático) e do horário em que as tarefas sejam realizadas (influência circadiana).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais**

Ratos Wistar machos, com 60-90 dias de vida, provenientes do biotério do Departamento de Psicobiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) foram usados no presente estudo. Os animais foram mantidos em grupo de 4-6 por gaiola (30 X 16 X 18 cm). Os mesmos foram submetidos a ciclos claro-escuro de 24 horas, sendo 12 horas de claro e 12 de escuro, controlados automaticamente, com as luzes acendendo às 07:00h (início da fase clara) e se apagando às 19:00h (início da fase escura). A temperatura do ambiente foi mantida a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Os animais tiveram acesso livre à água e comida durante todo o tempo (*ad libitum*). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP (CEP = 0645/05) e seguiu as normas internacionais para o uso de animais em pesquisa.

#### **3.2 Privação de sono**

O método de privação de sono que foi utilizado no presente estudo é o Método da Plataforma Múltipla Modificado (MPMM) (Suchecki & Tufik, 2000). Os animais são colocados em grupos socialmente estáveis em tanques (123 x 44 x 44 cm) preenchidos com água (até 1 cm da superfície superior da plataforma), sendo esta trocada diariamente. O tanque contém 13-15 plataformas com 6,5 cm de diâmetro, separadas entre si por cerca de 10 cm (**Figura 2**). Nestas condições, os animais têm a possibilidade de movimentar-se sobre as plataformas, reduzindo assim dois fatores estressantes: a restrição de movimentos e o isolamento social. Recentemente, o padrão de sono dos animais submetidos ao MPMM foi validado, demonstrando-se a perda total de

sono paradoxal com redução de aproximadamente 30% de sono de ondas lentas (Machado, Hipólido, Benedito-Silva, & Tufik, 2004). Os animais permaneceram nesses tanques por um período de 96h, período este em que se observa o déficit de memória (Bueno et al., 1994). Os animais do grupo controle foram mantidos em grupo de 4-6 por gaiola na mesma sala em que o procedimento de privação de sono foi realizado.

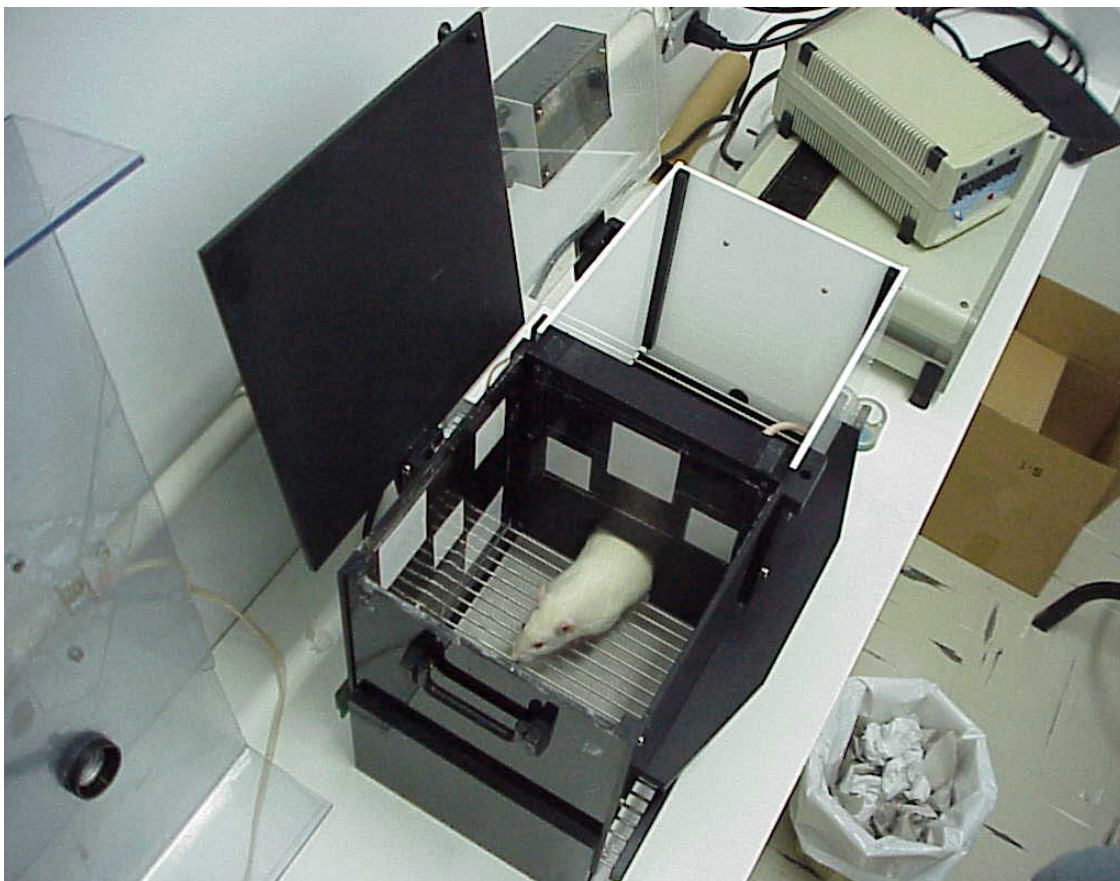


**Figura 2.** Método da plataforma múltipla modificada.

### ***3.3 Aparato para a avaliação da memória***

Para a tarefa de esquiva inibitória, foi utilizada uma caixa de condicionamento (**Figura 3**). A caixa consiste em dois compartimentos de mesma medida (base: 21 x 26 cm e altura: 27,5 cm). As paredes do compartimento seguro são brancas, e o outro (onde o animal recebe o choque)

é formado por paredes pretas, apresentando afixados em cada uma delas, alguns padrões visuais. A tampa do aparelho consiste em uma placa de acrílico transparente. A base da caixa acrílica é formada por barras metálicas condutoras de corrente elétrica dispostas de forma linear (cada barra medindo 0,4 cm de diâmetro e distantes 1,2 cm uma da outra), conectadas a um gerador de choque elétrico Ugo Basile (Passive Avoidance Controller CAT7551 Model), que produz uma corrente de 0,8mA (durante 1s), provocando um choque nas patas do animal.



**Figura 3.** Esquiva inibitória.

A tarefa de EI foi realizada na forma de treino, teste 1 (uma hora após o treino) e teste 2 (vinte e quatro horas após o treino), sendo um mesmo animal utilizado nessas três sessões (medida repetida). Na sessão de treino, cada

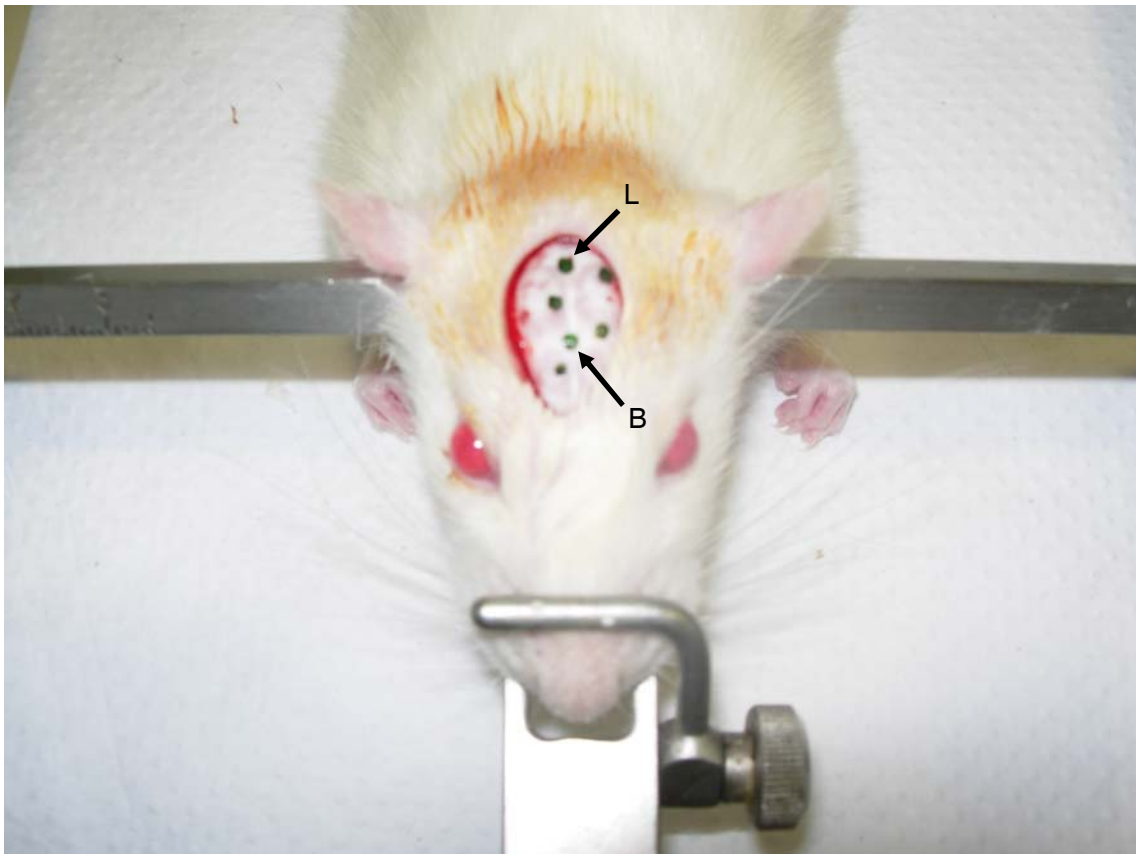


animal foi colocado no compartimento seguro do aparato, com a porta fechada. Dez segundos depois, a porta se abre automaticamente. Assim que o animal atravessa com as quatro patas para o compartimento aversivo, a porta se fecha, o animal recebe o choque, e a latência para a passagem é registrada. Aproximadamente 15 segundos depois, o animal é removido do aparato e colocado de volta na sua gaiola-moradia. Na sessão de testes, o animal é novamente colocado no compartimento seguro do aparato. A porta se abre dez segundos após, e a latência para a passagem para o compartimento aversivo é registrada mais uma vez. Durante os testes, nenhum choque é aplicado. Para cada animal é permitido um tempo máximo de 400 segundos para que acesse para o compartimento aversivo. Se isso não ocorrer, o animal é removido do aparato, e uma latência de 400 segundos é registrada.

### **3.4 Polissonografia**

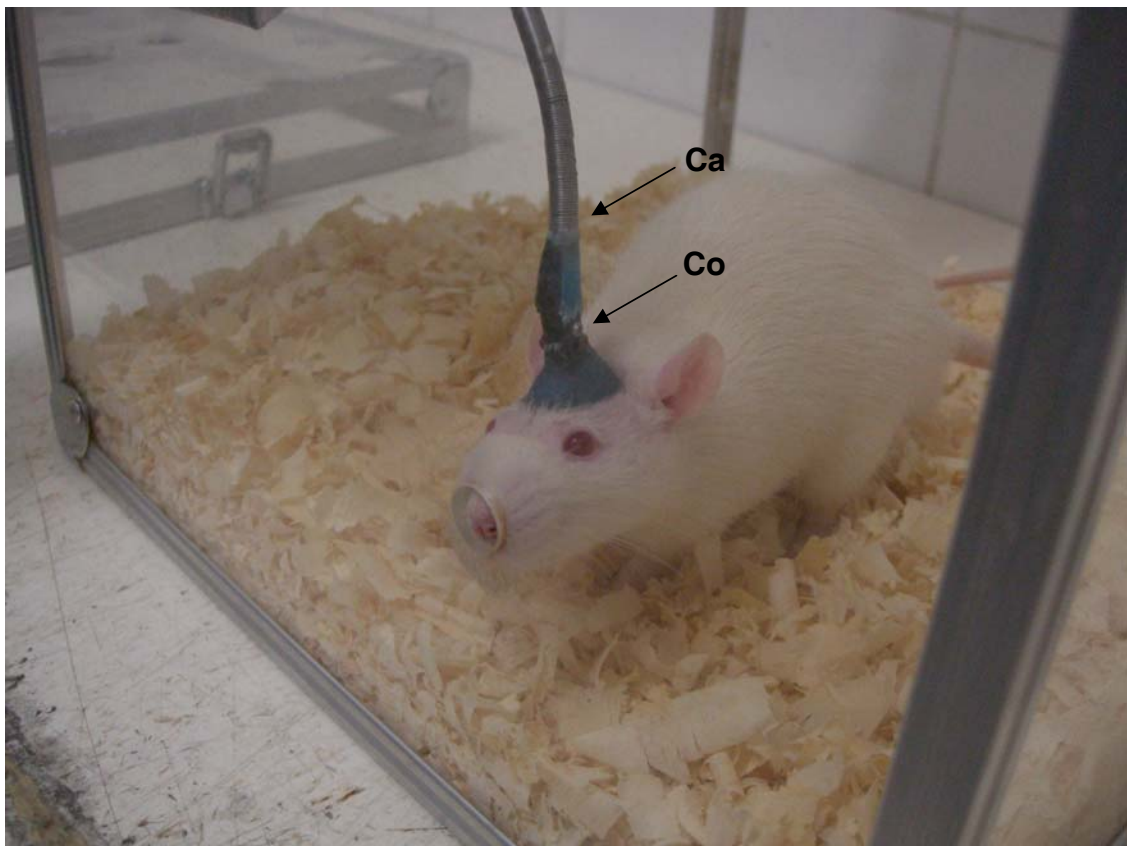
#### **3.4.1 Cirurgia**

Os animais foram submetidos à anestesia com diazepam e quetamina para implante dos eletrodos. Para tal, realizamos uma derivação cortical anterior (região frontal), para o registro do ritmo de ondas lentas, e uma posterior (região fronto-parietal - sobre o córtex relacionado com hipocampo dorsal), para o registro da atividade do ritmo teta (Timo-laria et al., 1970) (**figura 4**).



**Figura 4.** Animal posicionado no estereotático para implante dos eletrodos (pontos pretos). Setas indicam as referências do bregma (B) e lâmda (L).

Um par adicional de eletrodos de níquel-cromo foi implantado no músculo dorsal da região cervical para registro eletromiográfico. Os eletrodos foram soldados a um conector, que foi fixado ao crânio do animal com cimento dentário. O cabo para registro polissonográfico foi plugado ao conector (**figura 5**). Após a cirurgia, penicilina e diclofenaco foram administrados, e pelo menos 7 dias de recuperação foi dado para os animais.



**Figura 5.** Aspecto final do animal. Setas indicam o conector (Co) e o cabo (Ca) para registro polissonográfico.

### **3.4.2 Aparato de registro de sono**

Os sinais eletrocorticográficos (ECG) e eletromiográficos (EMG) foram registrados num polígrafo digital Neurofax QP 223 (Nihon Kohden, Tokio, Japan). Os registros foram estagiados em épocas de 30 segundos, de acordo com critérios descritos por Timo-laria et al (1970) em:

- a) Vigília: caracterizado por um sinal ECG de alta frequência e baixa amplitude (ritmos beta e teta) e por um sinal EMG intenso, denotando grande atividade muscular.

b) Sono de Ondas Lentas: caracterizado por um sinal ECG contínuo de alta amplitude e baixa frequência (ritmos alfa e delta), e por um sinal EMG de baixa amplitude e baixa frequência, sinalizando pouca atividade muscular.

c) Sono Paradoxal: caracterizado por um sinal ECG de alta frequência e baixa amplitude (ritmo teta) e um sinal EMG quase ausente, típico da atonia muscular encontrada neste estágio (Timo-laria et al., 1970).

d) Sono de Transição: caracterizado pela presença de fusos e ritmo teta.

Cada época de sono foi definida como um desses quatro estágios, cujo padrão de onda ocupou mais de 50% da época. Quando ruídos ou artefatos não permitiram a caracterização da época, os estágios foram determinados de acordo com as épocas vizinhas. Os animais foram habituados ao sistema de registro por 2 dias, antes que fosse registrado seu sono na condição basal (antes da privação de sono) por 2 dias.

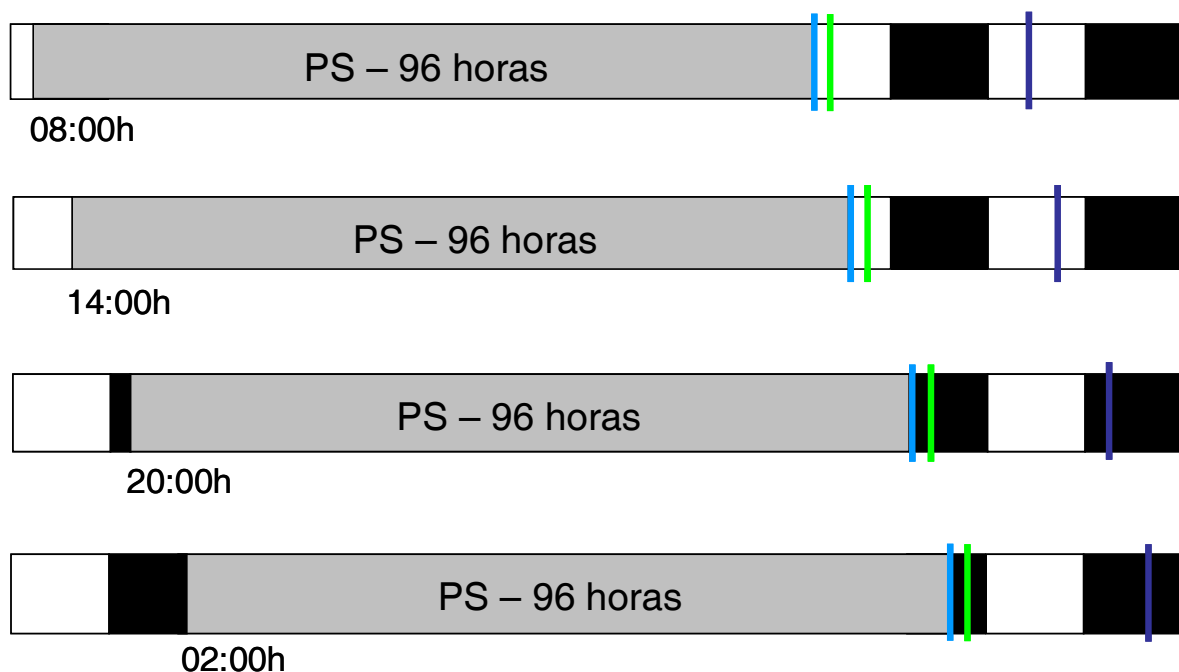
### ***3.5 Desenho Experimental***

#### **3.5.1 Experimento 1 - Avaliação do componente circadiano no desempenho da EI**

Nesse primeiro experimento, treinamos os animais na EI às 08:00h, 14:00h, 20:00h ou 02:00h, e o teste da tarefa foi realizado 1 hora (teste 1) e 24 horas (teste 2) depois da sessão de treino com objetivo de verificar se o desempenho nessa tarefa é diferente em relação ao horário do dia em que é avaliado (n = 12 por grupo).

### 3.5.2 Experimento 2 - Avaliação do desempenho na EI após privação de sono por 96 horas em diferentes horários do dia

Os animais foram submetidos à PS por 96 horas consecutivas, cujo procedimento teve início às 08:00h, 14:00h, 20:00h ou 02:00h (n = 24 por grupo para cada horário do experimento). Logo após o fim da privação de sono, os animais foram treinados na EI e o teste da tarefa foi realizado 1 hora (teste 1) e 24 horas (teste 2) depois da sessão de treino (**figura 6**).

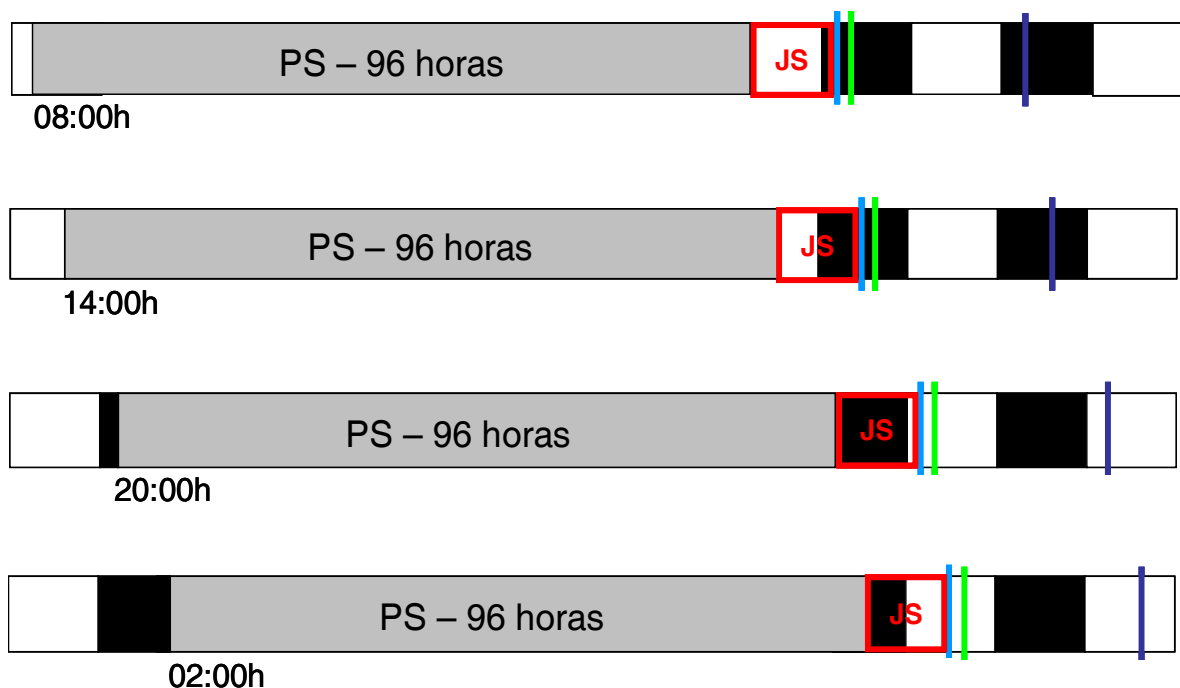


**Figura 6.** Desenho do Experimento 2

- = fase clara (das 07:00h às 19:00h).
- = fase escura (das 19:00h às 07:00h).
- = PS = privação de sono por 96 horas.
- | = Sessão de treino na EI, imediatamente após a PS.
- | = Sessão de teste 1 na EI (1h após a sessão de treino).
- | = Sessão de teste 2 na EI (24h após a sessão de treino).

### 3.5.3 Experimento 3 - Avaliação do desempenho na EI após privação de sono por 96 horas e janela de sono de 12 horas em diferentes horários do dia

Os animais foram privados de sono por 96 horas e, em seguida, foi dada a oportunidade para eles dormirem por 12 horas antes de realizarem o treino na tarefa de EI (**figura 7**). Como o procedimento de PS também começou às 08:00h, 14:00h, 20:00h ou 02:00h, a janela de sono após a privação aconteceu predominantemente durante a fase clara (ou fase de repouso do animal), durante a fase escura (ou fase de atividade do animal), ou dividida entre essas duas fases (n = 20-24 por horário do experimento, sendo 10-12 do grupo controle e 10-12 do grupo privado).



**Figura 7.** Desenho do Experimento 3

□ = fase clara (das 07:00h às 19:00h).

■ = fase escura (das 19:00h às 07:00h).

■ = PS = privação de sono por 96 horas.

■ = Sessão de treino na EI, imediatamente após a JS.

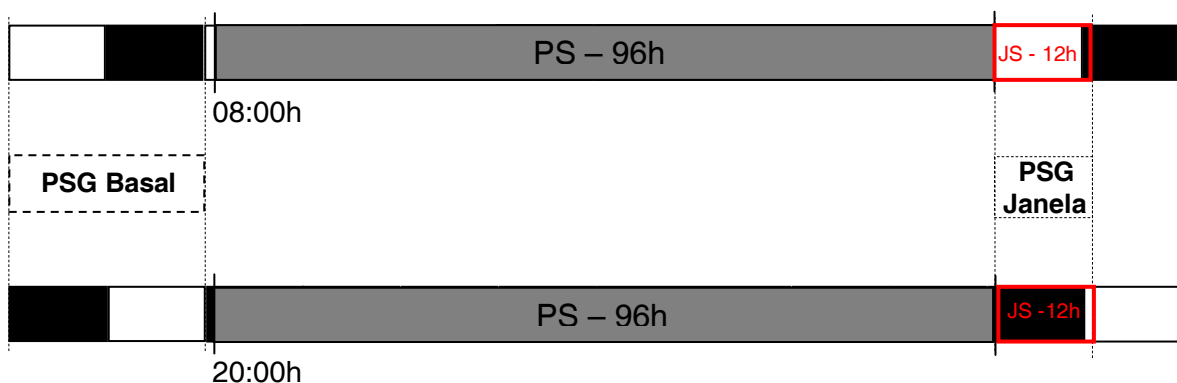
■ = Sessão de teste 1 na EI (1h após a sessão de treino).

■ = Sessão de teste 2 na EI (24h após a sessão de treino).




JS = janela de sono de 12 horas após a PS.

### 3.5.4 Experimento 4 – Registro polissonográfico da janela de sono de 12 horas nas fases clara e escura

Os animais foram privados de sono por 96 horas e posteriormente foi realizado registro polissonográfico da janela de sono de 12 horas, quando a mesma ocorre predominantemente durante a fase clara (ou fase de repouso do animal) ou durante a fase escura (ou fase de atividade do animal) (**figura 8**).



**Figura 8.** Desenho do Experimento 4:

-  = fase clara (das 07:00h às 19:00h).
-  = fase escura (das 19:00h às 07:00h).
-  = PS = privação de sono por 96 horas.
- JS-12h** = janela de sono de 12 horas após a privação de sono.
- PSG Basal = registro polissonográfico na condição basal.
- PSG Janela = registro polissonográfico na condição de janela do sono.

## 3.6 Análise estatística

### 3.6.1 Esquiva inibitória

A latência em segundos (s) para o animal passar para o compartimento aversivo na tarefa de EI foi analisada por uma ANOVA de duas vias e medidas repetidas, com Grupo (controle X privado) e Sessão (medida repetida: treino e testes) como fatores. Análises *post hoc* foram realizadas com teste de Tukey, com um nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

### 3.6.2 Registro de sono

Os seguintes parâmetros de PSG foram analisados:

- a) Eficiência do sono (tempo de sono / tempo de registro)
- b) Vigília (tempo de vigília / tempo de registro)
- c) Sono de Ondas Lentas (tempo de SOL / tempo de sono)
- d) Sono de Transição (tempo de ST / tempo de sono)
- e) Sono Paradoxal (tempo de SP / tempo de sono)
- f) Despertares (em número absoluto)

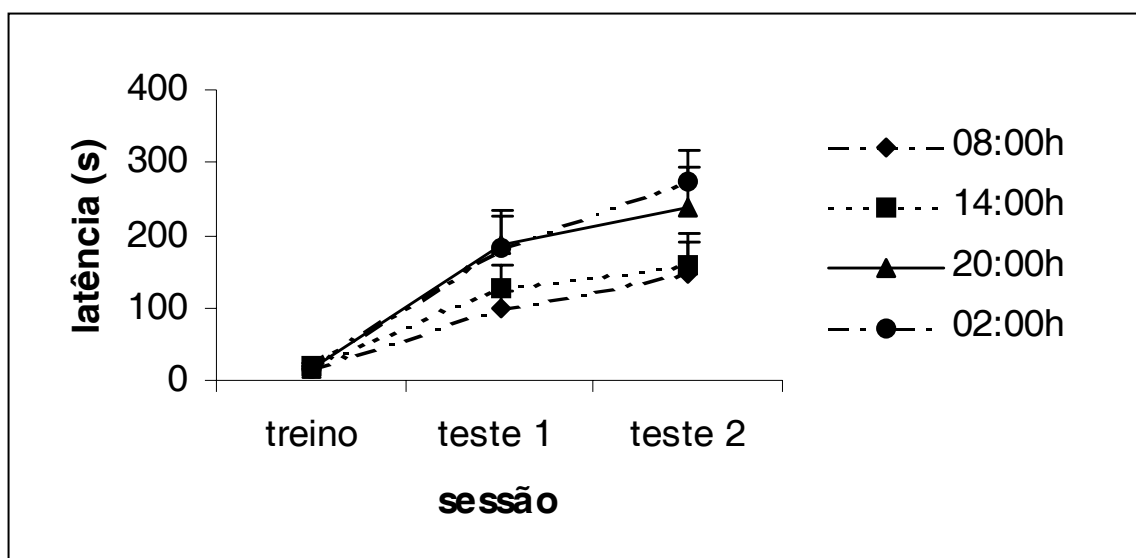
Foram aplicados testes t de Student não pareados para comparar a janela de sono na fase clara com a janela de sono na fase escura, e testes t de Student pareados para comparar a janela de sono com relação ao seu respectivo basal. O nível de significância adotado foi de  $p \leq 0,05$ .



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Experimento 1 - Avaliação do componente circadiano no desempenho da EI

A análise de variância não mostrou efeito significativo do fator grupo ( $F(3,44) = 2.21$ ,  $p = 0,10$ ), nem da interação ( $F(6,88) = 1,03$ ,  $p = 0,41$ ), entretanto há efeito significativo do fator sessão ( $F(2,88) = 36,65$ ,  $p < 0,0001$ ). Com a análise a posteriori de Tukey, verificamos que há diferença significativa entre todas as sessões ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9.** Efeito do horário do treino no desempenho dos animais na EI. Valores representados em média + EP.  $n = 12$  por grupo.

### 4.2 Experimento 2 - Avaliação do desempenho na EI após privação de sono por 96 horas em diferentes horários do dia

Os resultados desse experimento estão apresentados na forma de gráfico, separados por horário em cada sessão de teste (teste 1 e 2) em que o experimento foi realizado, conforme o desenho experimental (**figura 6**). Nesse experimento, a análise do desempenho dos animais dos grupos privado de

sono e controle não apresentou diferença estatística na sessão de treino. Os resultados referentes às sessões de testes estão descritos a seguir.

#### **4.2.1 Animais treinados na EI às 08:00h**

A análise de variância mostrou efeitos significativos dos fatores grupo ( $F(1,22) = 71,05$ ,  $p < 0,0001$ ) e sessão ( $F(2,44) = 25,25$ ,  $p < 0,0001$ ). Houve interação entre os fatores ( $F(2,44) = 9,55$ ,  $p < 0,0005$ ). A análise a posteriori de Tukey revelou que o grupo privado de sono tem desempenho significativamente prejudicado quando comparado com o grupo controle nas sessões de teste 1 ( $p < 0,0005$ ) (**figura 10-A**) e teste 2 ( $p < 0,0001$ ) (**figura 11-A**).

#### **4.2.2 Animais treinados na EI às 14:00h**

A análise de variância mostrou efeitos significativos dos fatores grupo ( $F(1,22) = 39,72$ ,  $p < 0,0001$ ) e sessão ( $F(2,44) = 26,93$ ,  $p < 0,0001$ ). Houve interação entre os fatores ( $F(2,44) = 15,81$ ,  $p < 0,0005$ ). A análise a posteriori de Tukey revelou que o grupo privado de sono tem desempenho significativamente prejudicado quando comparado com o grupo controle nas sessões de teste 1 ( $p < 0,0005$ ) (**figura 10-B**) e teste 2 ( $p < 0,0005$ ) (**figura 11-B**).

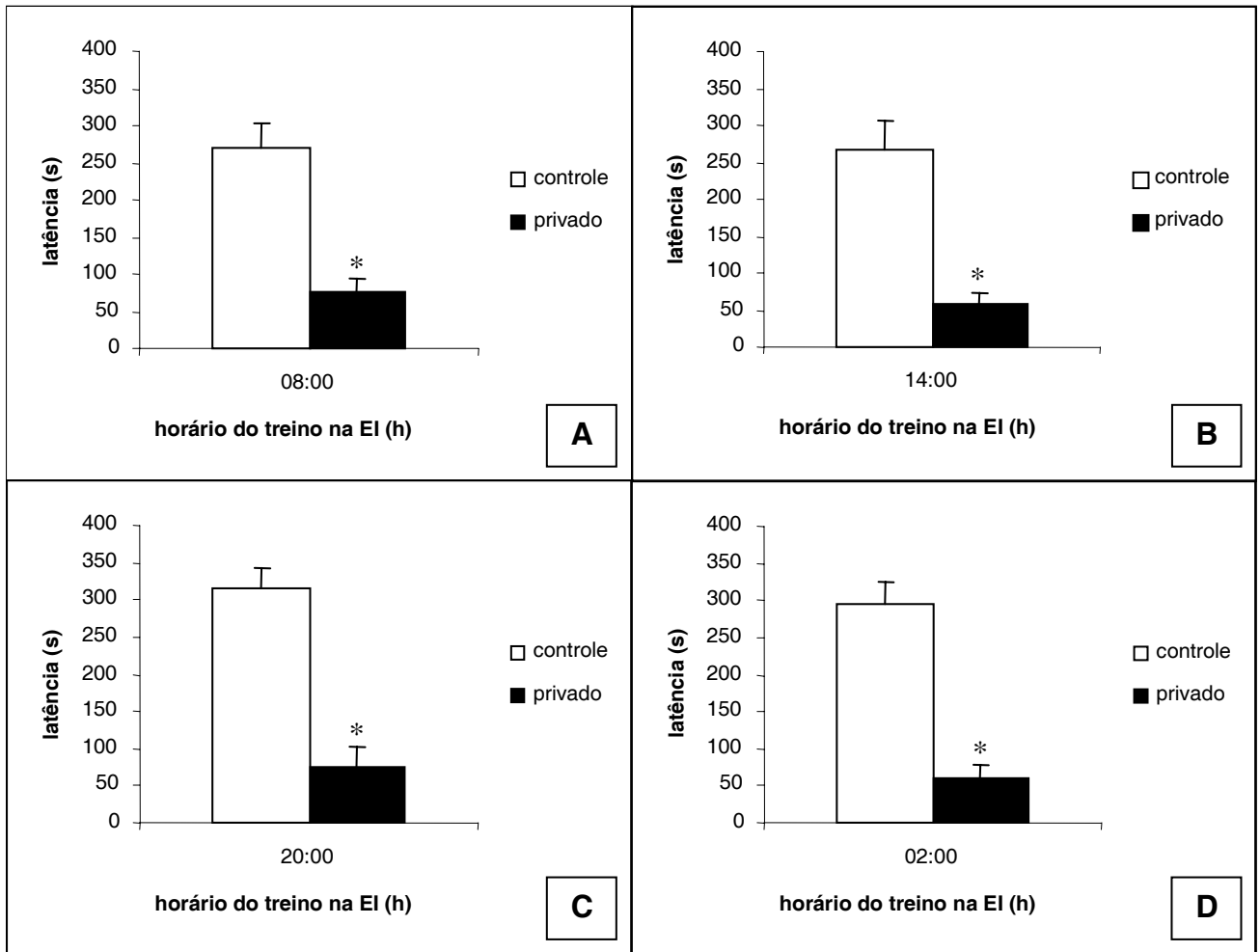
#### **4.2.3 Animais treinados na EI às 20:00h**

A análise de variância mostrou efeitos significativos dos fatores grupo ( $F(1,22) = 68,50$ ,  $p < 0,0001$ ) e sessão ( $F(2,44) = 57,82$ ,  $p < 0,0001$ ). Houve interação entre os fatores ( $F(2,44) = 30,77$ ,  $p < 0,0005$ ). A análise a posteriori de Tukey revelou que o grupo privado de sono tem desempenho

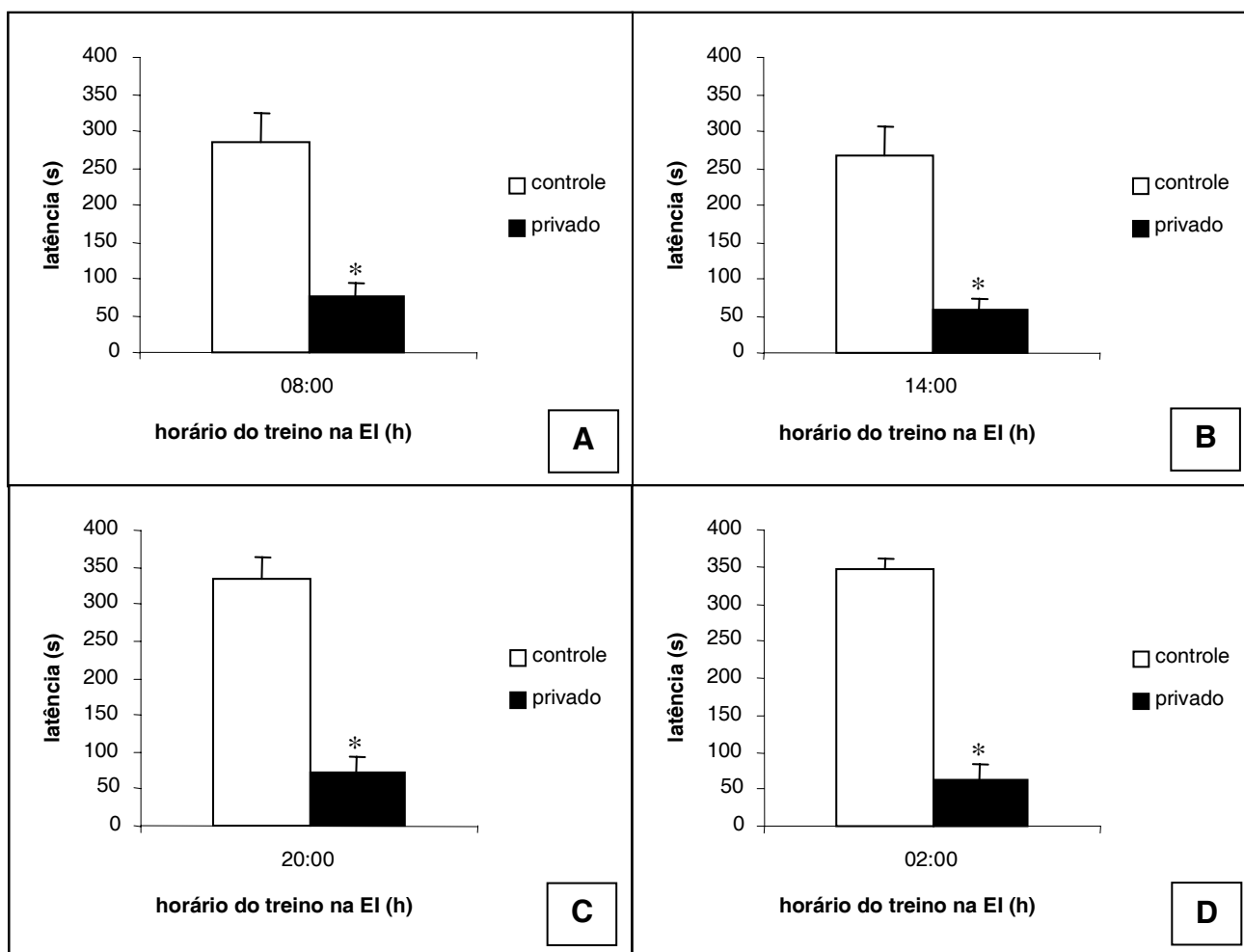
significativamente prejudicado quando comparado com o grupo controle nas sessões de teste 1 ( $p < 0,0005$ ) (**figura 10-C**) e teste 2 ( $p < 0,0005$ ) (**figura 11-C**).

#### **4.2.4 Animais treinados na EI às 02:00h**

A análise de variância mostrou efeitos significativos dos fatores grupo ( $F(1,22) = 131,38$ ,  $p < 0,0001$ ) e sessão ( $F(2,44) = 65,09$ ,  $p < 0,0001$ ). Houve interação entre os fatores ( $F(2,44) = 35,54$ ,  $p < 0,0001$ ). A análise a posteriori de Tukey revelou que o grupo privado de sono tem desempenho significativamente prejudicado quando comparado com o grupo controle nas sessões de teste 1 ( $p < 0,0005$ ) (**figura 10-D**) e teste 2 ( $p < 0,0005$ ) (**figura 11-D**).



**Figura 10.** Efeito da privação de sono por 96 horas sobre o desempenho dos ratos no teste 1 da esquiiva inibitória (EI), quando o treino foi realizado às 08:00h (A), 14:00h (B), 20:00h (C) ou 02:00h (D). Valores representados em média + erro padrão. \*  $p < 0,05$  vs grupo controle em cada horário correspondente (teste de Tukey).



**Figura 11.** Efeito da privação de sono por 96 horas sobre o desempenho dos ratos no teste 2 da esquiua inibitória (EI), quando o treino foi realizado às 08:00h (A), 14:00h (B), 20:00h (C) ou 02:00h (D). Valores representados em média + erro padrão. \*  $p < 0,05$  vs grupo controle em cada horário correspondente (teste de Tukey).

### ***4.3 Experimento 3 - Avaliação do desempenho na EI após privação de sono por 96 horas e janela de sono de 12 horas em diferentes horários do dia***

Os resultados estão apresentados na forma de gráfico para as sessões de testes (teste 1 e 2), conforme o desenho experimental (**figura 7**). Da mesma forma como ocorreu no experimento anterior, a análise do desempenho dos animais dos grupos privado de sono e controle não apresentou diferença estatística na sessão de treino.

#### **4.3.1 Animais treinados na EI às 08:00h**

A análise de variância mostrou efeitos significativos dos fatores grupo ( $F(1,22) = 13,23$ ,  $p < 0,005$ ) e sessão ( $F(2,44) = 36,72$ ,  $p < 0,0001$ ) e também revelou uma tendência à interação entre os fatores ( $F(2,44) = 2,96$ ,  $p = 0,06$ ). Dessa forma, optou-se por fazer uma análise separada entre o treino e o teste 1, e entre o treino e o teste 2. Assim, comparando treino com teste 1, encontramos efeitos significativos dos fatores grupo ( $F(1,22) = 7,13$ ,  $p < 0,05$ ) e sessão ( $F(1,22) = 71,83$ ,  $p < 0,0001$ ), bem como da interação ( $F(1,22) = 6,44$ ,  $p < 0,05$ ). Comparando treino com teste 2, encontramos efeitos significativos dos fatores grupo ( $F(1,22) = 5,76$ ,  $p < 0,05$ ) e sessão ( $F(1,22) = 70,23$ ,  $p < 0,0001$ ), bem como da interação ( $F(1,22) = 4,38$ ,  $p < 0,05$ ). Dessa forma, foi realizada uma análise a posteriori de Tukey, que revelou que o grupo privado de sono tem desempenho significativamente prejudicado quando comparado ao grupo controle nas sessões de teste 1 ( $p < 0,01$ ) (**figura 12-A**) e teste 2 ( $p < 0,05$ ) (**figura 13-A**).

#### **4.3.2 Animais treinados na EI às 14:00h**

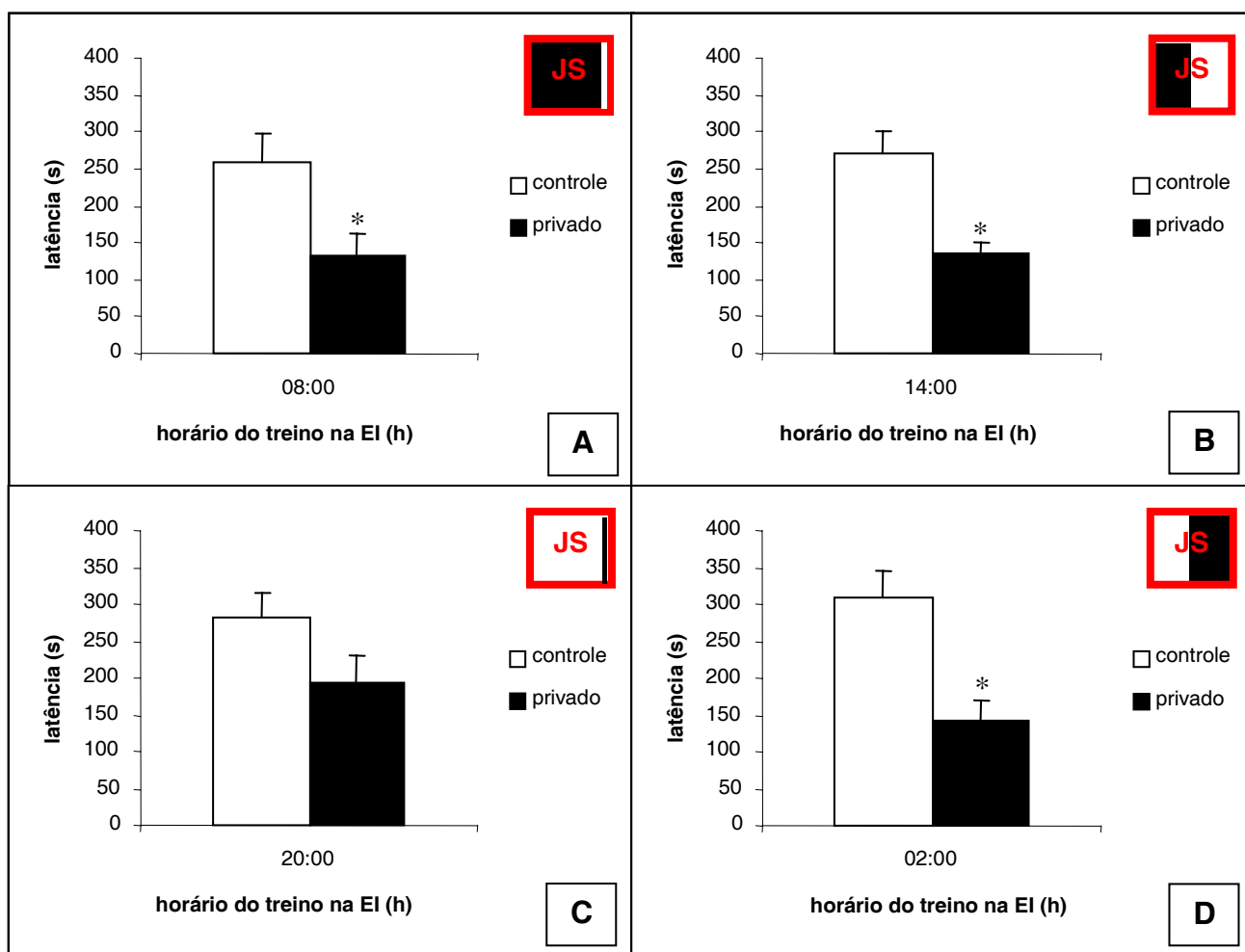
A análise de variância mostrou efeitos significativos dos fatores grupo ( $F(1,20) = 14,66, p < 0,005$ ) e sessão ( $F(2,40) = 38,66, p < 0,0001$ ). Houve interação entre os fatores ( $F(2,40) = 5,29, p < 0,01$ ). A análise a posteriori de Tukey revelou que o grupo privado de sono tem desempenho significativamente prejudicado quando comparado com o grupo controle nas sessões de teste 1 ( $p < 0,05$ ) (**figura 12-B**) e teste 2 ( $p < 0,05$ ) (**figura 13-B**).

#### **4.3.3 Animais treinados na EI às 20:00h**

A análise de variância não mostrou efeito significativo do fator grupo ( $F(1,22) = 3,59, p = 0,072$ ) nem da interação ( $F(2,44) = 1,22, p = 0,3$ ). Houve efeito do fator sessão ( $F(2,44) = 35,23, p < 0,0001$ ) (**figuras 12-C e 13-C**).

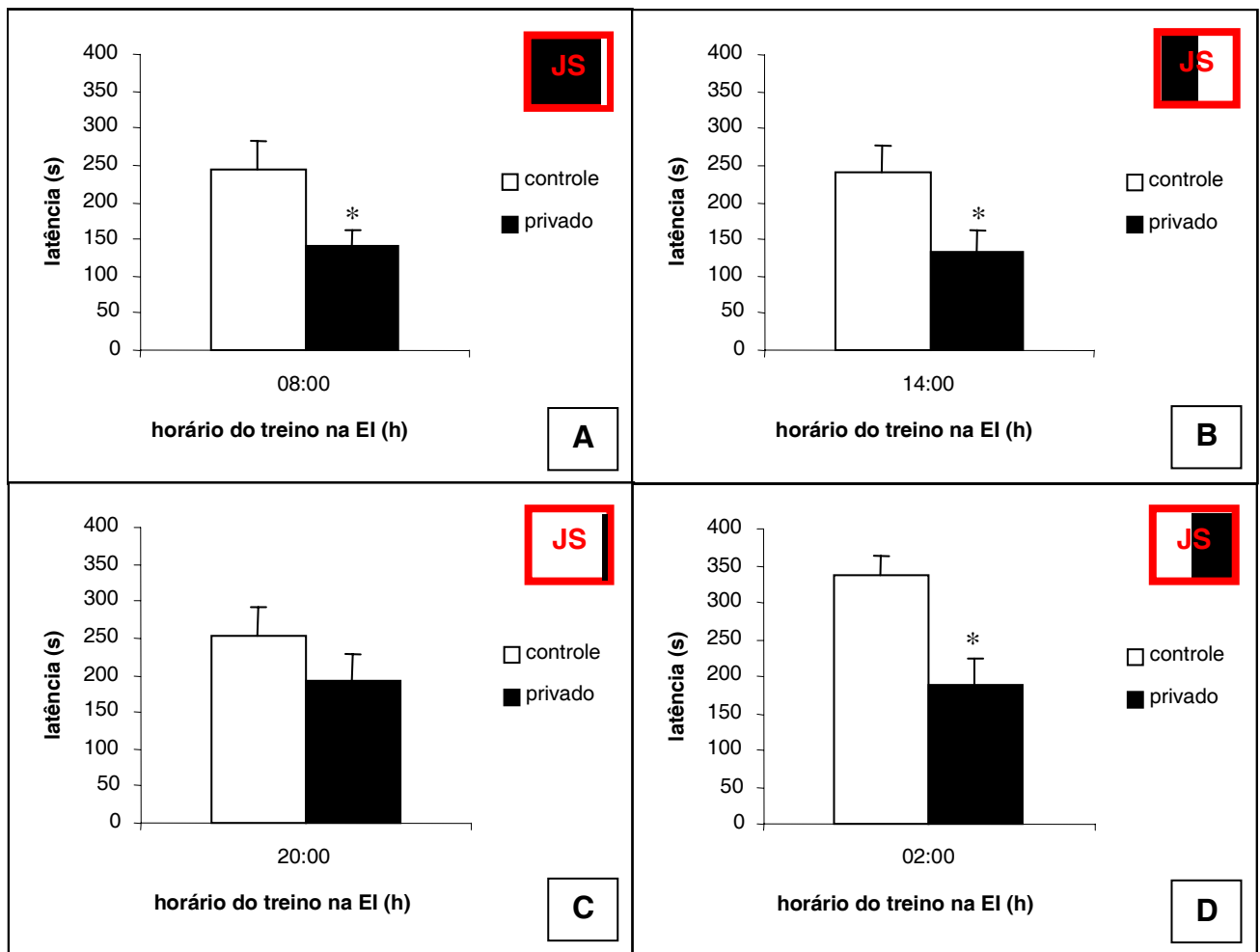
#### **4.3.4 Animais treinados na EI às 02:00h**

A análise de variância mostrou efeitos significativos dos fatores grupo ( $F(1,22) = 17,26, p < 0,0005$ ) e sessão ( $F(2,44) = 49,86, p < 0,0001$ ). Houve interação entre os fatores ( $F(2,44) = 7,33, p < 0,005$ ). A análise a posteriori de Tukey revelou que o grupo privado de sono tem desempenho significativamente prejudicado quando comparado com o grupo controle nas sessões de teste 1 ( $p < 0,01$ ) (**figura 12-D**) e teste 2 ( $p < 0,05$ ) (**figura 13-D**).



**Figura 12.** Efeito da privação de sono (96 horas) seguida de 12 horas de janela de sono sobre o desempenho de ratos na esquiwa inibitória (EI) no teste 1 quando a sessão de treino foi realizada às 08:00h (A), 14:00h (B), 20:00h (C) ou 02:00h (D). Valores representados em média + erro padrão. \* p < 0,05 vs grupo controle em cada horário correspondente (teste de Tukey). No canto superior direito de cada gráfico está representada a janela de sono (JS) correspondente.





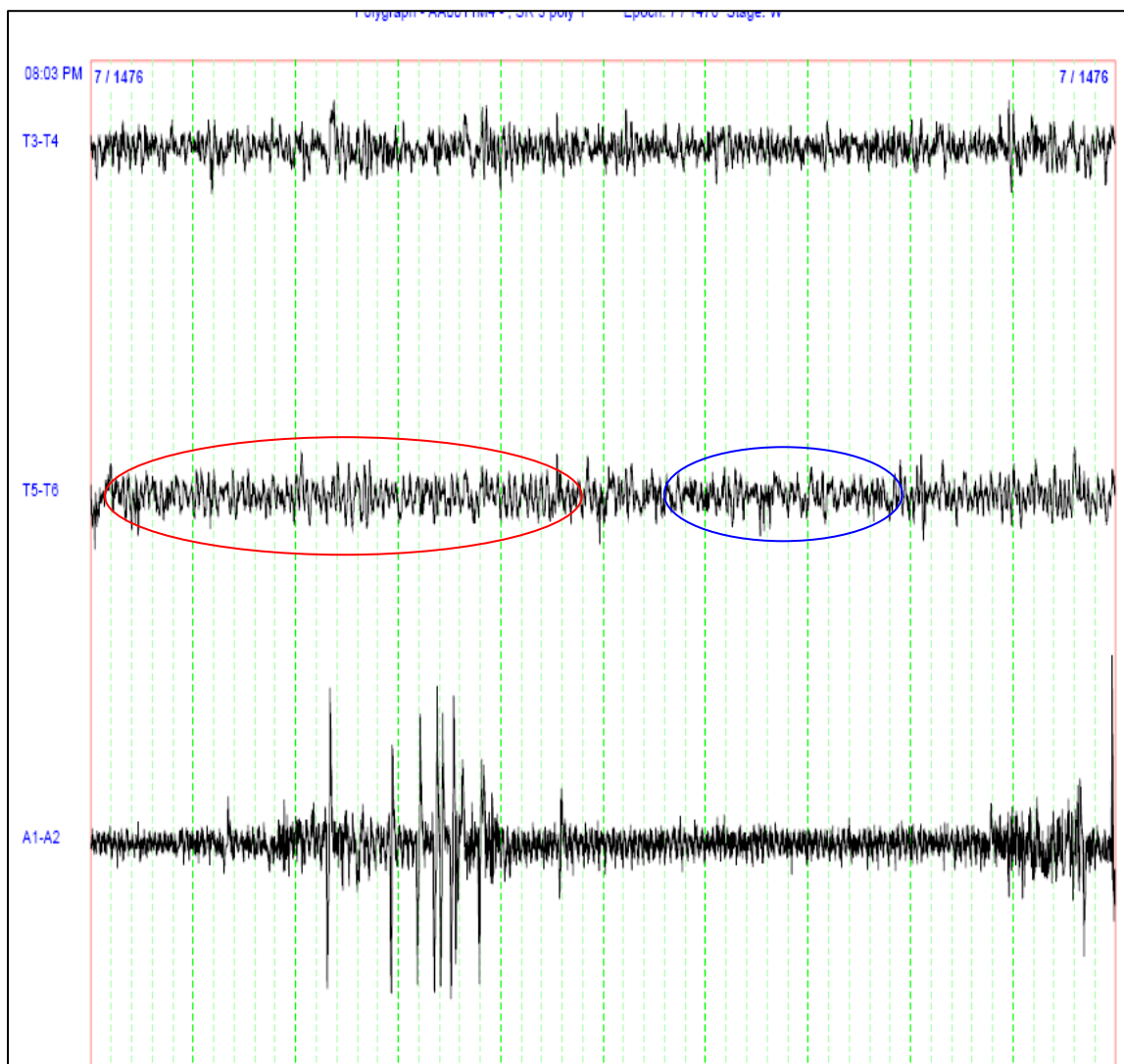
**Figura 13.** Efeito da privação de sono (96 horas) seguida de 12 horas de janela de sono sobre o desempenho de ratos na esquila inibitória (EI) no teste 2 quando a sessão de treino foi realizada às 08:00h (A), 14:00h (B), 20:00h (C) ou 02:00h (D). Valores representados em média + erro padrão. \*  $p < 0,05$  vs grupo controle em cada horário correspondente (teste de Tukey). No canto superior direito de cada gráfico está representada a janela de sono (JS) correspondente.

#### **4.4 Experimento 4 – Registro polissonográfico da janela de sono de 12 horas nas fases clara e escura**

Conforme demonstrado nos resultados do Experimento 3, a ocorrência da janela de sono de 12 horas predominantemente na fase clara (fase de repouso do animal) previne o prejuízo no desempenho na EI de ratos privados de sono por 96 horas. Dessa forma, levantamos a hipótese de que a arquitetura do sono na janela seja diferente, quando a mesma acontece na fase clara ou na fase escura. Assim, para testar esta hipótese, o sono dos animais durante a janela na fase clara e na fase escura foi registrado, com o objetivo de encontrar alterações polissonográficas (PSG) que possam justificar a prevenção ou não do desempenho desses animais na EI após a privação de sono por 96 horas (**figura 8**).

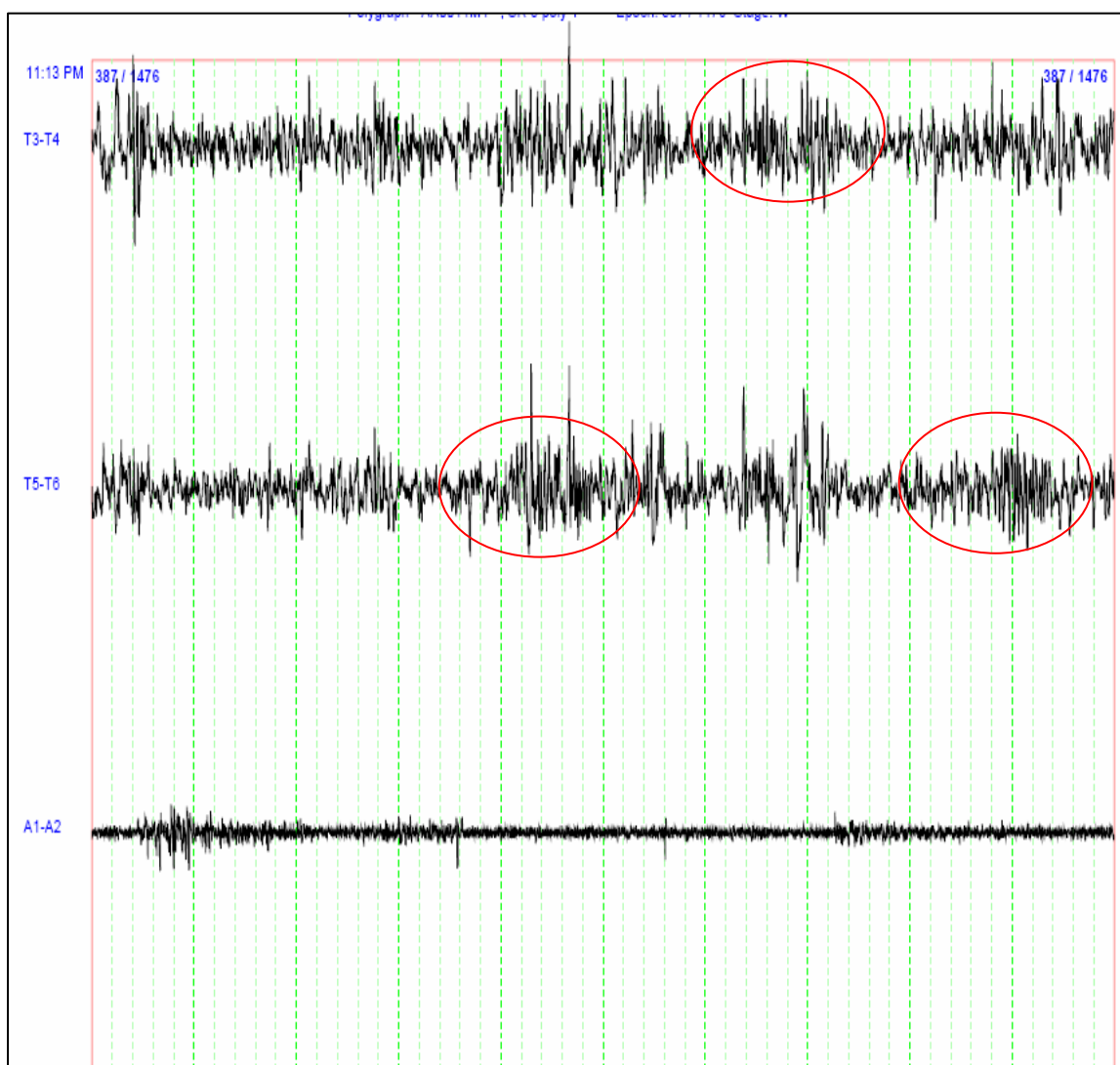
A leitura do registro polissonográfico foi realizada considerando-se quatro fases: vigília, sono de ondas lentas (SOL), sono de transição (ST) e sono paradoxal (SP). As figuras mostradas a seguir são exemplos das diferentes fases consideradas. Cada figura representa uma época de sono de 30 segundos (conforme descrito na metodologia) com três derivações, sendo que as duas primeiras derivações representam o registro eletrocorticográfico, e a última derivação representa o registro eletromiográfico.

## Fase de Vigília



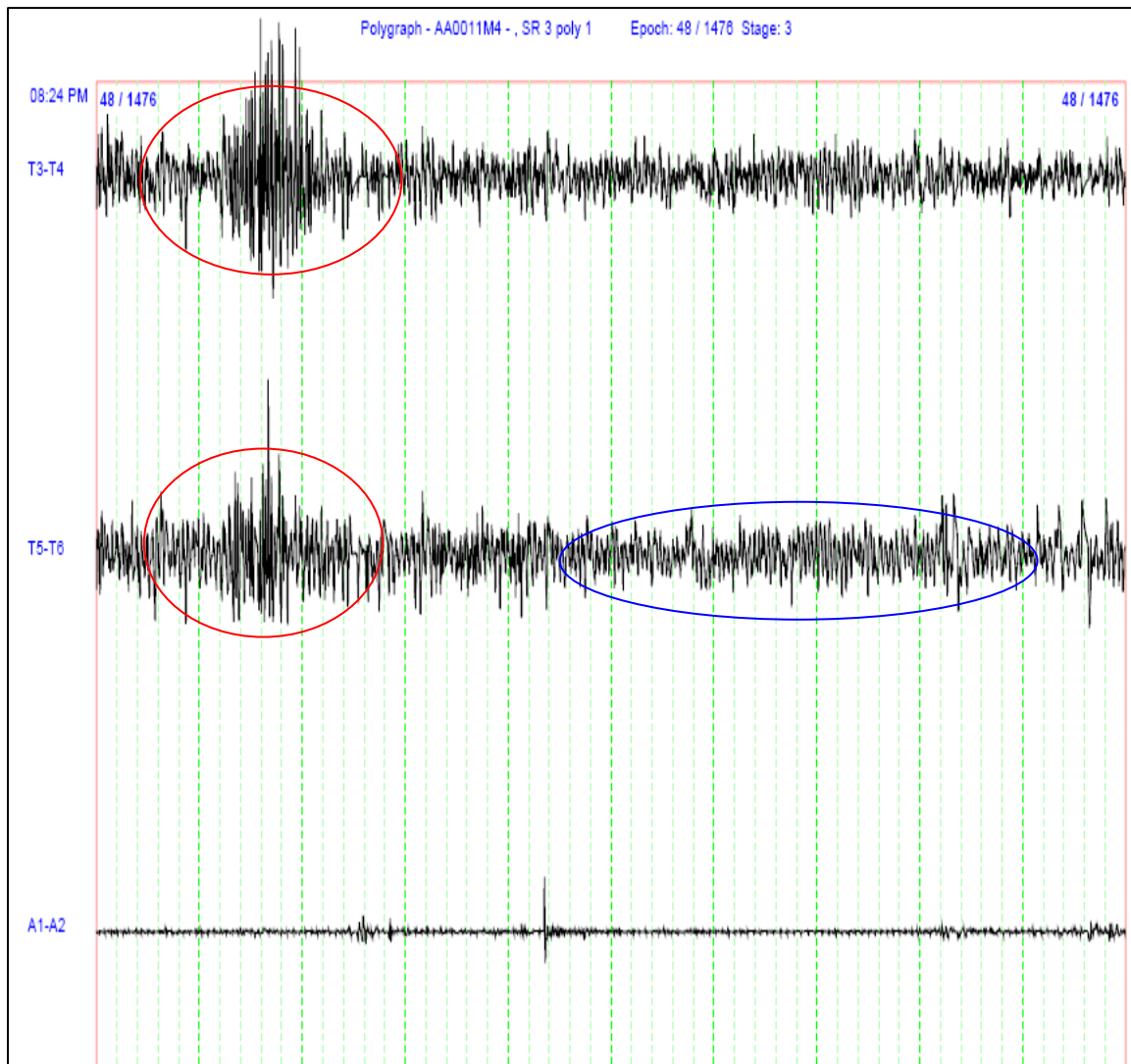
**Figura 14.** Representação da fase de vigília do rato, caracterizada pela presença dos ritmos teta (círculo vermelho) e beta (círculo azul) nas derivações corticais e intensa atividade na derivação muscular.

## Fase de Sono de Ondas Lentas



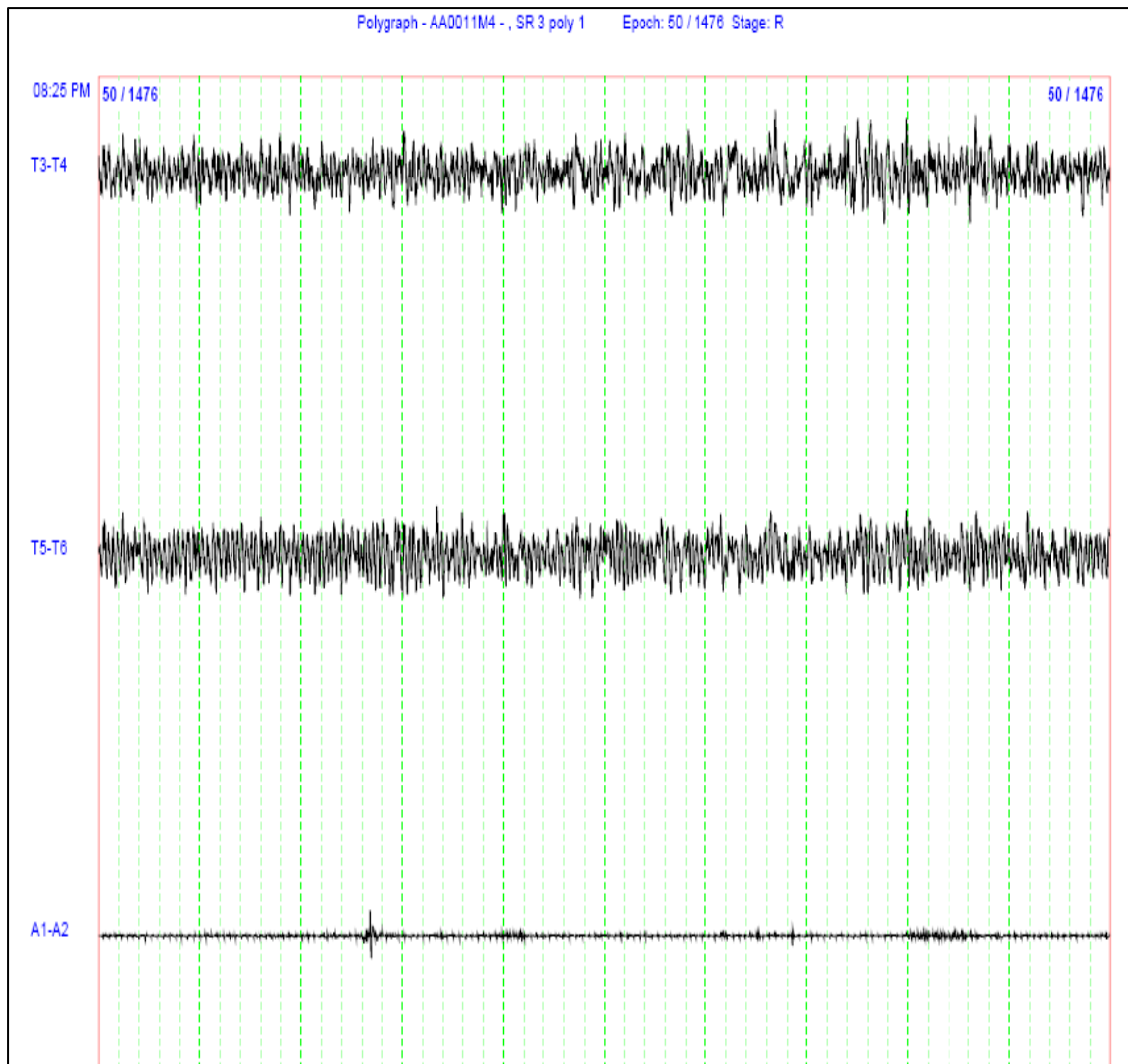
**Figura 15.** Representação da fase de sono de ondas lentas do rato, caracterizada pela presença de fusos do sono e redução na atividade muscular.

## Fase de Sono de Transição



**Figura 16.** Representação da fase de sono de transição do rato, caracterizada pela presença de fusos (círculo vermelho) e ritmo teta (círculo azul).

### Fase de Sono Paradoxal



**Figura 17.** Representação da fase de sono paradoxal do rato, caracterizada pela presença de ritmo teta e perda do tônus muscular.

Os resultados gerais da avaliação dos diversos parâmetros do registro polissonográfico são mostrados na tabela 1, com comparações entre as condições (basal X rebote), e também na condição de rebote entre as fases (claro X escuro), conforme descritos na metodologia.

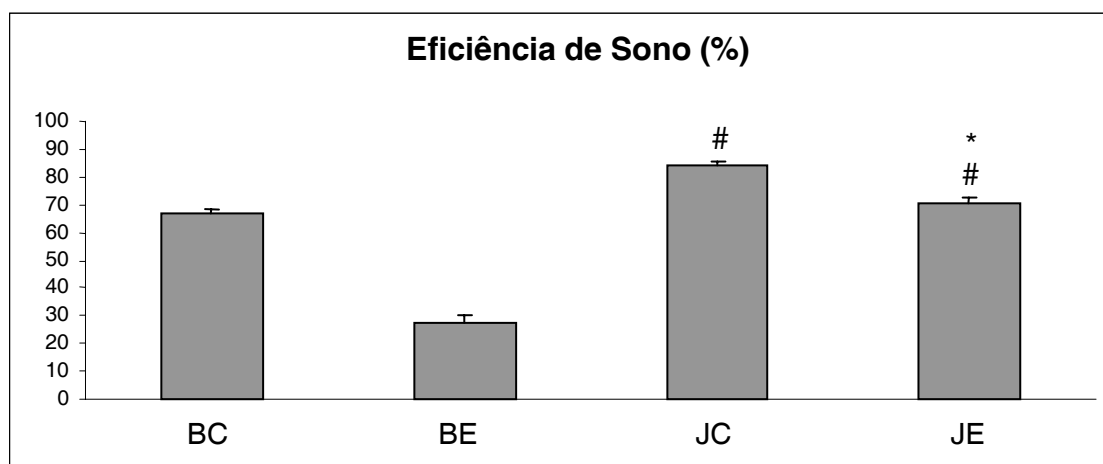
**Tabela 1.** Parâmetros de sono nas condições basal e janela de sono durante as fases clara e escura.

	Fase Clara		Fase Escura	
	Basal	Janela	Basal	Janela
ES (%)	66,8 ± 3,8	84,4 ± 3,2 #	27,1 ± 8,1	70,7 ± 5,1 # *
V (%)	33,2 ± 3,8	15,6 ± 3,2 #	72,9 ± 8,1	29,3 ± 5,1 # *
SOL (%)	75,4 ± 3,3	51,5 ± 5,8 #	86,2 ± 4,5	57,7 ± 3,7 # *
ST (%)	6,9 ± 1,1	7,6 ± 1,5	4,1 ± 1,5	7,7 ± 3,2 #
SP (%)	17,7 ± 2,6	40,9 ± 5,8 #	9,7 ± 3,3	34,6 ± 5,4 #
Despertares (Nº)	30,4 ± 10,0	20,0 ± 8,9 #	20,7 ± 5,2	40,7 ± 8,6 # *

Valores estão expressos em percentagens do tempo (média ± D.P.) para eficiência de sono (ES), vigília (V), sono de ondas lentas (SOL), sono de transição (ST) e sono paradoxal (SP). O número de despertares (D) está representado em valores absolutos (média ± D.P.). \*  $p < 0,05$  vs fase clara na mesma condição. #  $p < 0,05$  vs condição basal na mesma fase.

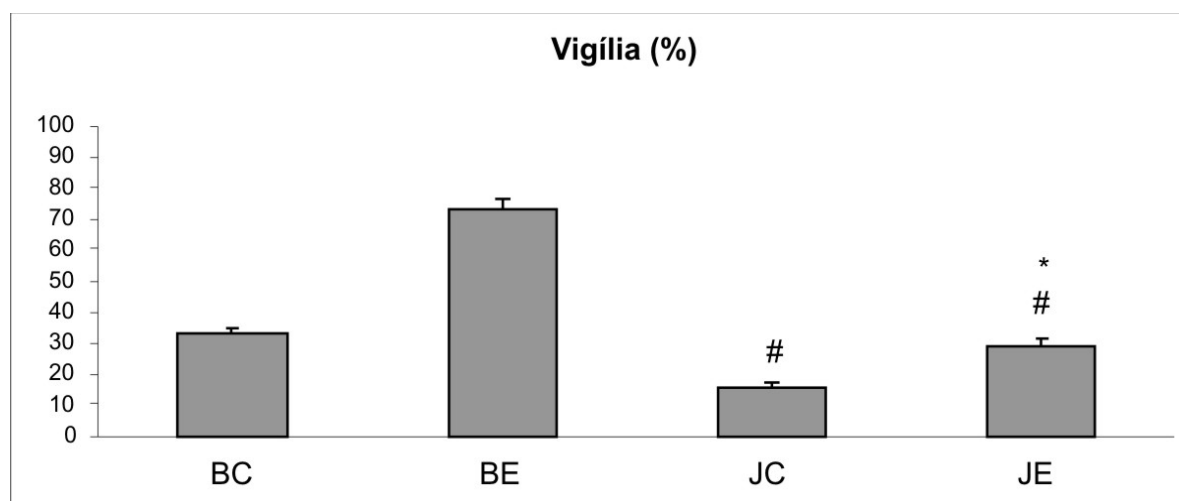
Os resultados específicos de cada parâmetro serão mostrados na forma de gráfico separadamente. O registro polissonográfico dos animais na fase clara da condição basal será denominado de basal claro (BC), e na fase escura da condição basal será denominado de basal escuro (BE). O registro polissonográfico dos animais durante a condição de janela de sono (12 horas) nas fases clara e escura será denominado de JC e JE, respectivamente.

**Eficiência de sono** - O teste t de Student não pareado mostra que a JC tem eficiência de sono significativamente maior que a JE ( $p < 0,01$ ). O teste t de Student pareado mostra que a JC tem eficiência de sono significativamente maior que o BC ( $p < 0,01$ ), e que a JE tem tempo de sono significativamente maior que o BE ( $p < 0,01$ ), conforme a figura a seguir.



**Figura 18.** Porcentagem do tempo de sono. Valores representados em média + desvio padrão. \*  $p < 0,05$  vs fase clara na mesma condição. #  $p < 0,05$  vs condição basal na mesma fase. BC: registro basal na fase clara; BE: registro basal na fase escura; JC: registro durante a janela de sono na fase clara; JE: registro durante a janela de sono na fase escura.

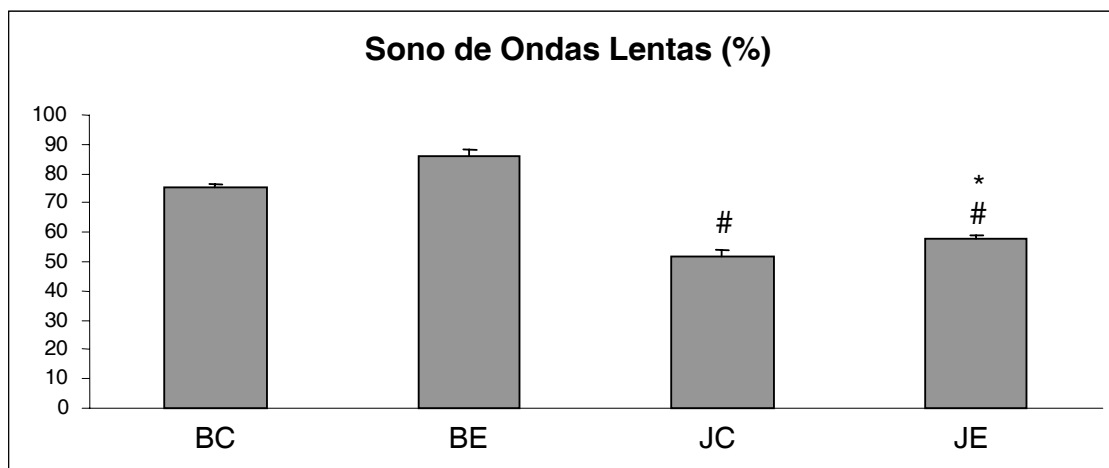
**Tempo total de vigília** - O teste t de Student não pareado mostra que a JC tem tempo de vigília significativamente menor que a JE ( $p < 0,01$ ). O teste t de Student pareado mostra que a JC tem tempo de vigília significativamente menor que o BC ( $p < 0,01$ ), e que a JE tem tempo de vigília significativamente menor que o BE ( $p < 0,01$ ), conforme a figura a seguir.





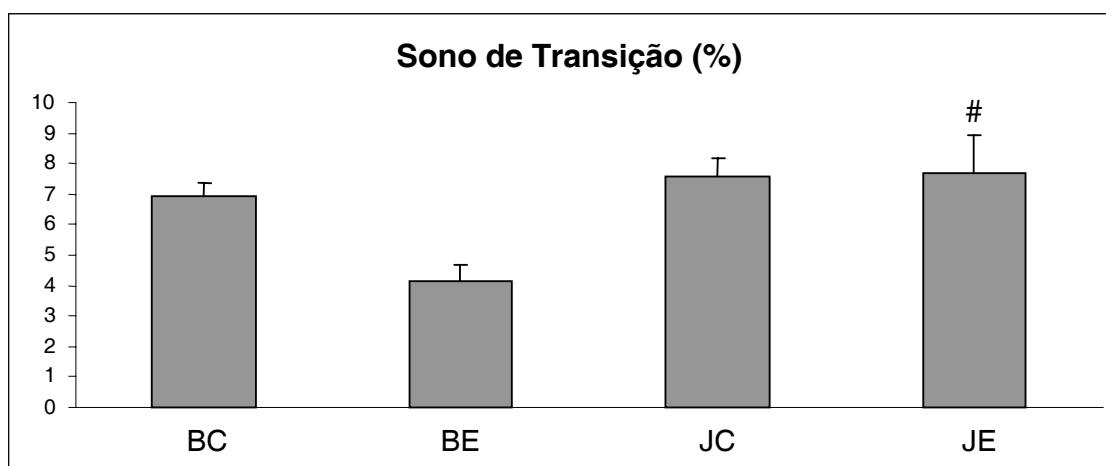
**Figura 19.** Porcentagem do tempo de vigília. Valores representados em média + desvio padrão. \*  $p < 0,05$  vs fase clara na mesma condição. #  $p < 0,05$  vs condição basal na mesma fase. BC: registro basal na fase clara; BE: registro basal na fase escura; JC: registro durante a janela de sono na fase clara; JE: registro durante a janela de sono na fase escura.

**Tempo total de Sono de Ondas Lentas** - O teste t de Student não pareado mostra que a JC tem tempo de SOL significativamente menor que a JE ( $p = 0,03$ ). O teste t de Student pareado mostra que a JC tem tempo de SOL significativamente menor que o BC ( $p < 0,01$ ), e que a JE tem tempo de SOL significativamente menor que o BE ( $p < 0,01$ ), conforme a figura a seguir.



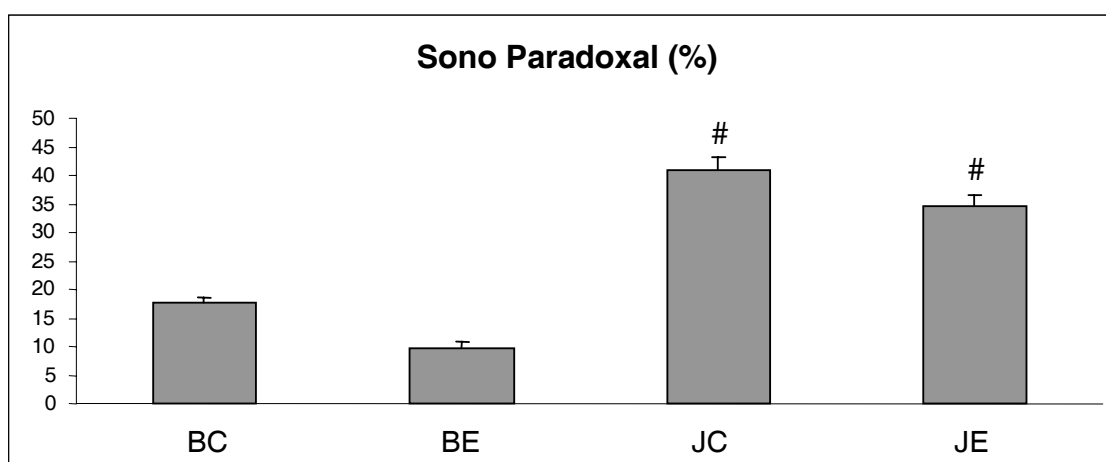
**Figura 20.** Porcentagem do tempo de sono de ondas lentas. Valores representados em média + desvio padrão. \*  $p < 0,05$  vs fase clara na mesma condição. #  $p < 0,05$  vs condição basal na mesma fase. BC: registro basal na fase clara; BE: registro basal na fase escura; JC: registro durante a janela de sono na fase clara; JE: registro durante a janela de sono na fase escura.

**Tempo total de Sono de Transição** - O teste t de Student não pareado mostra que a JC tem tempo de sono de transição significativamente igual à JE ( $p = 0,93$ ). O teste t de Student pareado mostra que a JC tem tempo de sono de transição significativamente igual ao BC ( $p = 0,30$ ), e que a JE tem tempo de sono de transição significativamente maior que o BE ( $p = 0,03$ ), conforme a figura a seguir.



**Figura 21.** Porcentagem do tempo de sono de transição. Valores representados em média + desvio padrão. #  $p < 0,05$  vs condição basal na mesma fase. BC: registro basal na fase clara; BE: registro basal na fase escura; JC: registro durante a janela de sono na fase clara; JE: registro durante a janela de sono na fase escura.

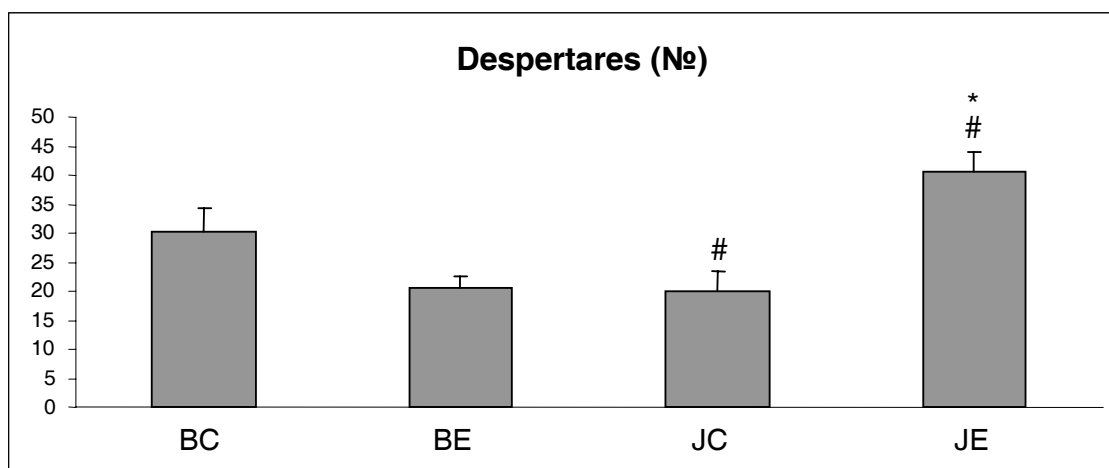
**Tempo total de Sono Paradoxal** - O teste t de Student não pareado mostra que a JC tem tempo de sono paradoxal significativamente igual à JE ( $p = 0,06$ ). O teste t de Student pareado mostra que a JC tem tempo de sono paradoxal significativamente maior que o BC ( $p < 0,01$ ), e que a JE tem tempo de sono paradoxal significativamente maior que o BE ( $p < 0,01$ ), conforme a figura a seguir.



**Figura 22.** Porcentagem do tempo de sono paradoxal. Valores representados em média + desvio padrão. #  $p < 0,05$  vs condição basal na mesma fase. BC: registro

basal na fase clara; BE: registro basal na fase escura; JC: registro durante a janela de sono na fase clara; JE: registro durante a janela de sono na fase escura.

**Despertares** - O teste t de Student não pareado mostra que a JC tem número de despertares significativamente menor que a JE ( $p < 0,01$ ). O teste t de Student pareado mostra que a JC tem número de despertares significativamente menor que o BC ( $p < 0,01$ ), e que a JE tem número de despertares significativamente maior que o BE ( $p < 0,01$ ), conforme a figura a seguir.



**Figura 23.** Número de despertares. Valores representados em média + desvio padrão. \*  $p < 0,05$  vs fase clara na mesma condição. #  $p < 0,05$  vs condição basal na mesma fase. BC: registro basal na fase clara; BE: registro basal na fase escura; JC: registro durante a janela de sono na fase clara; JE: registro durante a janela de sono na fase escura.

## 5. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstram que ratos privados de sono por 96 horas têm prejuízo no desempenho na tarefa de EI em diferentes momentos circadianos, tanto na fase clara como na fase escura. Além disso, encontramos também que a janela de sono de 12 horas após a privação de sono somente previne esse prejuízo quando acontece predominantemente durante a fase clara, ou seja, durante a fase de repouso desses animais.

Inicialmente, avaliamos a presença de ritmicidade circadiana no desempenho dos ratos na EI, treinando-os nessa tarefa em diferentes horas do dia (08:00h, 14:00h, 20:00h e 02:00h). Nesse primeiro experimento, observamos que os animais aprenderam a tarefa, e que não existem diferenças significativas no desempenho quando comparamos os diferentes horários do treino na EI, apesar de encontrarmos uma tendência de melhor desempenho durante a fase escura (20:00h e 02:00h). Entretanto, a literatura nos mostra resultados conflitantes com relação à aplicação de tarefas de memória em diferentes horas do dia. Méndez-Díaz e colaboradores (2005) encontraram melhor desempenho durante a fase escura na tarefa de labirinto circular de Barnes. Em outro trabalho, não foi encontrada diferença circadiana no labirinto em cruz elevado, nem no labirinto aquático (Beeler, Prendergast & Zhuang, 2006).

Com relação à esquiva inibitória, dois estudos demonstram desempenho melhor durante a fase clara (Davies, Navaratnam, & Redfern, 1973; Yamada & Iwasaki, 1994). Entretanto, ressaltamos que algumas diferenças na metodologia são encontradas em relação ao presente trabalho: a) ambos utilizaram ratos com idade e linhagens diferentes, bem como utilizaram um

protocolo diferente, tanto em relação ao tamanho da caixa quanto em relação à intensidade e duração do choque; e b) esses trabalhos utilizaram um mesmo nível de iluminação, independente da fase circadiana em que testaram seus animais, diferentemente do presente trabalho. Neste, a tarefa de EI foi utilizada com intensidades de luz diferentes, ou seja, durante a fase clara (08:00h e 14:00h) os animais foram testados numa sala iluminada, e durante a fase escura (20:00h e 02:00h) os animais foram testados numa sala escura. Nessa tarefa, o animal é colocado num ambiente claro (aversivo) para que o mesmo tenha estímulo para passar para o ambiente escuro (menos aversivo). Quando os mesmos são testados numa sala escura, essa diferença de intensidade luminosa não mais será tão acentuada, fazendo com que o ambiente claro fique menos aversivo para o animal, o que pode conseqüentemente alterar seu desempenho. As contradições encontradas nos estudos sobre a modulação circadiana em tarefas relacionadas com a memória, em parte se deve a impossibilidade de repetir a mesma medida em um mesmo animal em diferentes horários do dia e, dessa forma, cada horário do dia acaba representando um grupo experimental diferente.

No segundo experimento, comparamos o desempenho na EI após PS por 96 horas em animais treinados imediatamente após a PS em diferentes horários do dia. Nesse experimento, encontramos que em todos os horários os animais privados de sono tiveram desempenho prejudicado em relação aos controles. Além disso, observamos também que esse prejuízo ocorre tanto na memória de curto-prazo (avaliada no teste 1, ou seja, uma hora após o treino) como na memória de longo-prazo (avaliada no teste 2, ou seja, vinte e quatro horas após o treino). Essa separação entre memória de curto e longo-prazo é

baseada nos estudos de Izquierdo e colaboradores, com o uso de inibidor de síntese protéica. Nesse estudo, observa-se que o uso de inibidor de síntese protéica, quando administrado até uma hora e meia após o treino na EI, não prejudica o desempenho nessa tarefa. Como a memória de curto-prazo é independente de síntese protéica, os autores consideram que a memória de curto-prazo ocorre em até uma hora e meia após o treino na EI, sendo a de longo-prazo ocorrendo num tempo superior à uma hora e meia do treino nessa tarefa (Izquierdo, Medina, Vianna, Izquierdo, & Barros, 1999). Dessa forma, nossos resultados corroboram os outros diversos estudos em nosso laboratório, que encontraram prejuízo de memória de curto-prazo (Dubiel et al., 2005) e de longo-prazo (Moreira et al., 2003; Bueno et al., 1994) na EI em ratos privados de sono, adicionando que este prejuízo é independente da fase circadiana.

Como o componente homeostático pode ser verificado a partir da propensão ao sono durante o rebote após uma PS, avaliamos se a existência de uma janela de sono de 12 horas poderia prevenir o prejuízo de memória na EI, e também se esta prevenção seria dependente da fase circadiana. Nesse terceiro experimento, encontramos que os animais privados de sono tinham desempenho significativamente prejudicado em relação aos controles em todos os horários testados, com exceção dos animais treinados às 20:00h, ou seja, quando a janela de sono de 12 horas aconteceu predominantemente durante na fase clara, ou fase de repouso do animal. Assim, pode-se concluir que somente quando há coincidência entre os fatores homeostáticos (devido à janela de sono de 12 horas) e a fase circadiana de propensão ao sono (a fase clara ou de repouso), os animais não apresentam desempenho na EI

prejudicado pela PS. Isto sugere que o padrão de sono durante essa janela de sono é diferente entre as fases circadianas, indicando que o padrão de sono durante o rebote é dependente de uma possível interação entre os componentes homeostáticos e circadianos no rebote de sono.

A possibilidade da interação entre os componentes homeostático e circadiano foi aventada inicialmente por Daan, Beersma & Borbély (1984), e confirmada em estudos comportamentais (Van Dongen & Dinges, 2000; Wright Jr. et al., 2006), e neuroanatômicos mais recentes (Sigworth & Rea, 2003; Deurveilher & Semba, 2005). Assim, realizamos um último experimento, com registro polissonográfico durante a janela de sono na fase clara e na fase escura, com o objetivo de investigar se há diferenças na arquitetura do sono que possam justificar a prevenção do prejuízo do desempenho na EI, após privação e rebote de sono.

Os resultados desse experimento demonstram que há rebote de sono tanto na fase clara quanto na fase escura, pois encontramos aumento no tempo de sono (e conseqüentemente diminuição do tempo de vigília) nas duas condições de rebote, quando comparamos com a condição basal. Esses resultados confirmam eletrofisiologicamente que o método utilizado para PS foi eficiente, estando assim de acordo com trabalhos prévios em nosso laboratório (Machado, Hipólido, Benedito-Silva, & Tufik, 2004), em que foi demonstrada uma privação total de sono paradoxal e parcial (aproximadamente 30%) do SOL.

Por outro lado, como a duração da PS foi a mesma, tanto para os animais que tiveram rebote na fase clara como para os da fase escura, esperava-se que o componente homeostático no rebote deveria ser o mesmo

para as duas fases. Entretanto, o resultado indica que há uma modulação circadiana na propensão ao sono durante o rebote, pois os animais que tiveram rebote na fase clara apresentaram um percentual de sono maior que os animais que tiveram rebote na fase escura. Dessa forma, podemos concluir que tanto o componente homeostático como o circadiano estão presentes no rebote, já que há mais tempo de sono no rebote na fase clara que na fase escura. Deboer, Détári & Meijer (2007) também mostram a persistência do componente circadiano (representado pelo registro da atividade neuronal no núcleo supraquiasmático) após a privação de sono. Nesse trabalho encontrou-se uma diminuição de aproximadamente 60% dessa atividade neuronal (em comparação com o registro basal) após a PS por 6 horas durante a fase de repouso.

Outros estudos, utilizando lesão do núcleo supraquiasmático, encontraram que o componente circadiano poderia modular o componente homeostático no rebote de sono. Mendelson, Bergmann & Tung (2003) observaram aumento de sono paradoxal e de ondas lentas, no início do rebote de sono, em ratos submetidos à lesão do núcleo supraquiasmático. Outro estudo, também com lesão desse núcleo, encontrou que o componente circadiano modula a distribuição temporal do rebote de sono, mas não a quantidade de sono durante o rebote (Mistlberger, Bergmann, Waldenar, & Rechtschaffen, 1983).

Quando analisamos com mais detalhes o sono, vemos que os animais que tiveram rebote na fase clara têm menos SOL que os que tiveram rebote na fase escura. Entretanto, não encontramos diferença com relação ao sono de transição, nem com relação ao sono paradoxal. Como o SOL representa o



componente homeostático (Daan, Beersma, & Borbély, 1984; Deboer & Tobler, 2003), nossos resultados indicam que a pressão ao sono em decorrência do componente homeostático é menor durante o rebote na fase clara. Por outro lado, nossos resultados mostram que há um aumento da quantidade de sono paradoxal quando comparamos janela de sono após a PS (tanto na fase clara como na fase escura) com a condição basal. Esses dados em conjunto mostram claramente que sono paradoxal também é modulado pelo componente homeostático. Todavia não encontramos um maior rebote de sono paradoxal na fase clara quando comparamos com o rebote na fase escura, apesar de haver uma tendência importante ( $p = 0,06$ ). Como os animais somente não apresentam déficit de memória com um rebote de sono ocorrendo predominantemente na fase clara, podemos sugerir que a prevenção do déficit de memória não foi decorrente somente da pressão homeostática ao SOL, pois na fase clara há menos rebote de SOL. Embora a quantidade de sono paradoxal não tenha sido significativamente diferente (apesar de encontrarmos uma tendência, como dito anteriormente) durante o rebote na fase clara e na fase escura, a pressão homeostática ao sono paradoxal pode ter sido fundamental para essa prevenção do déficit de memória.

Nesse último experimento, encontramos também que, no rebote de sono durante a fase escura, há um número significativamente maior de despertares quando comparamos com o rebote durante a fase clara, indicando que o rebote na fase escura apresenta uma maior fragmentação do sono. Isto significa que o padrão de sono foi diferente durante o rebote na fase clara e na fase escura, e que o rebote na fase clara foi eficiente para a prevenção do déficit de memória na tarefa de EI, já que nessa situação há uma coincidência entre os

componentes homeostático e circadiano para a propensão ao sono. Dessa forma, podemos concluir que o rebote de sono na fase clara apresenta, além de uma maior quantidade de sono, uma maior qualidade de sono, pois o sono se apresenta menos fragmentado e conseqüentemente mais organizado. Esses resultados estão de acordo com os trabalhos mais recentes que apontam que a consolidação da memória não depende somente do SOL ou do sono paradoxal, mas sim de uma organização das fases do sono (Ambrosini & Giuditta, 2001), o que poderia ser medido por um menor número de despertares, indicando uma menor fragmentação do sono.

## 6. CONCLUSÕES

1. Os ratos não apresentam diferenças no desempenho da tarefa da esquiva inibitória (EI) em relação ao horário do dia em que os mesmos são treinados, especificamente às 08h, 14h, 20h e 02h.

2. A privação de sono provoca prejuízo no desempenho de ratos na tarefa da EI, independentemente do horário do dia (08h, 14h, 20h e 02h) em que é realizada.

3. A privação de sono não provoca perda da ritmicidade circadiana durante o rebote de sono, e este sistema continua modulando a expressão do sono, fazendo com que o rebote seja diferente, dependendo da fase circadiana em que ocorre.

4. A prevenção do déficit de memória na tarefa da esquiva inibitória, após o rebote de sono (12h), é modulada pela interação entre os sistemas circadiano e homeostático, e isto pode não ter relação direta com a quantidade do SOL ou do sono paradoxal, mas sim com a menor fragmentação do sono.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akerstedt, T., & Folkard, S. (1995). Validation of the S and C components of the three-process model of alertness regulation. *Sleep*, 18 (1), 1-6.

Ambrosini, M.V., & Giuditta, A. (2001). Learning and sleep: the sequential hypothesis. *Sleep Medicine Reviews*, 5 (6), 477-490.

Ambrosini, M.V., Langella, M., Gironi Carnevale, U.A., & Giuditta, A. (1992). The sequential hypothesis of sleep function. The structure of postacquisition sleep in learning and nonlearning rats. *Physiology Behavior*, 51 (2), 217-226.

Beeler, J.A., Prendergast, B., & Zhuang, X. (2006). Low amplitude entrainment of mice and the impact of circadian phase on behavior tests. *Physiology & Behavior*, 87 (5), 870-880.

Benington, J.H., & Heller, H.C. (1995). Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Progress in Neurobiology*, 45, 347-360.

Bonnet, M.H., & Arand, D.L. (1995). We are chronically sleep deprived. *Sleep*, 18 (10), 908-911.

Borbély A.A. (1980). Sleep: Circadian rhythm versus recovery process. In M. Koukkou, D. Lehmann & J. Angst (Eds.), *Functional States of the Brain: Their Determinants* (pp. 151-161). Amsterdam: Elsevier.

Borbély, A.A. (1982). A two process model of sleep regulation. *Human Neurobiology*, 1 (3), 195-204.

Borbély, A.A. & Achermann, P. (1999). Sleep homeostasis and models of sleep regulation. *Journal of Biological Rhythms*, 14 (6), 559-568.

Borbély, A.A., & Achermann, P. (2000). Sleep homeostasis and models of sleep regulation. In M.G. Kryger, T. Roth & W. C. Dement (Eds.), *Principles and Practice of Sleep Medicine* (3<sup>a</sup> ed., pp. 377-390) Philadelphia: WB Saunders.

Broadbent, N.J., Squire, L.R., & Clark, R.E. (2004). Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *PNAS*, *101* (40), 14515-14520.

Bueno, O.F., Lobo, L.L., Oliveira, M.G., Gugliano, E.B., Pomarico, A.C., & Tufik, S. (1994). Dissociated paradoxical sleep deprivation effects on inhibitory avoidance and conditioned fear. *Physiology & Behavior*, *56* (4), 775-779.

Bueno, O.F.A., Oliveira, M.G.M., Lobo, L.L., Morais, P.R., Melo, F.H.M., & Tufik, S. (2000). Cholinergic modulation of inhibitory avoidance impairment induced by paradoxical sleep deprivation. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*, *24*, 595-606.

Campbell, I.G., Guinan, M.J., & Horowitz J.M. (2002). Sleep deprivation impairs long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology*, *88*, 1073-1076.

Cantero, J.L., Atienza, M., Stickgold, R., Kahana, M.J., Madsen, J.R., & Kocsis, B. (2003). Sleep-dependent theta oscillations in the hippocampus and neocortex. *Journal of Neuroscience*, *23*, 10897–10903.

Chaudhury, D., & Colwell, C.S. (2002). Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice. *Behavioural Brain Research*, *133*, 95-108.

Czeisler, C.A., Duffy, J.F., Shanahan, T.L., Brown, E.N., Mitchell, J.F., Rimmer, D.W., Ronda, J.M., Silva, E.J., Allan, J.S., Emens, J.S., Dijk, D., & Kronauer, R.E. (1999). Stability, precision and near 24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science*, *284*, 2177-2181.

Daan, S., Beersma, D.G., & Borbély, A.A. (1984). Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *American Journal of Physiology*, 246 (2 Pt 2), R161-R183.

Dametto, M., Suchecki, D., Bueno, O.F.A., Moreira, K.M., Tufik, S., & Oliveira, M.G.M. (2002). Social stress does not interact with paradoxical sleep deprivation-induced memory impairment. *Behavioural Brain Research*, 129, 171-178.

Datta, S. (2000). Avoidance task training potentiates phasic pontine-wave density in the rat: A mechanism for sleep-dependent plasticity. *Journal of Neuroscience*, 20 (22), 8607–8613.

Davis, C.J., Harding, J.W., & Wright, J.W. (2003). REM sleep deprivation-induced deficits in the latency-to-peak induction and maintenance of long-term potentiation within the CA1 region of the hippocampus. *Brain Research*, 973, 293-297.

Davies, J.A., Navaratnam, V., & Redfern P.H. (1973). A 24-hour rhythm in passive-avoidance behaviour in rats. *Psychopharmacologia*, 32, 211-214.

Deboer, T., Détári, L., & Meijer, J.H. (2007). Long term effects of sleep deprivation on the mammalian circadian pacemaker. *Sleep*, 30 (3), 257-262.

Deboer, T., & Tobler, I. (2003). Sleep regulation in the Djungarian hamster: comparison of the dynamics leading to the slow-wave activity increase after sleep deprivation and daily torpor. *Sleep*, 26 (5), 567-572.

Deurveilher, S., & Semba, K. (2005). Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience*, 130 (1), 165-183.

Devan, B.D., Goad, E.H., Petri, H.L., Antoniadis, E.A., Hong, N.S., Ko, C.H., Leblanc, L., Lebovic, S.S., Lo, Q., Ralph, M.R., & McDonald, R.J. (2001). Circadian phase-shifted rats show normal acquisition but impaired long-term retention of place information in the water task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 75, 51-62.

De Koninck, J., Lorrain, D., Christ, G., Proulx, G., & Coulombe, D. (1989). Intensive language learning and increases in rapid eye movement sleep: evidence of a performance factor. *International Journal of Psychophysiology* (8), 43-47.

Díez-Noguera, A. & Diambra, L. (2003). Modelagem dos ritmos biológicos. Em N. Marques & L. Menna-Barreto (Eds.), *Cronobiologia: Princípios e Aplicações* (3ª ed., pp. 119-132). São Paulo: Editora Fiocruz.

Dinges, D.F., Orne, E.C., Evans, F.J., & Orne, M.T. (1981). Performance after naps in sleep-conducive and learning environments. In L.C. Johnson, D.I. Tepas, W.P. Colquhoun & M.J. Colligan (Eds.), *Biological Rhythms, Sleep and Shift Work* (pp. 539-552). New York: Spectrum.

Dubiela, F.P., Oliveira, M.G.M., Moreira, K.M., Nobrega, J.N., Tufik, S., & Hipólido, D.C. (2005). Learning deficits induced by sleep deprivation and recovery are not associated with altered [<sup>3</sup>H]muscimol and [<sup>3</sup>H]flunitrazepam binding. *Brain Research*, 1037, 157-163.

Edgar, D.M., Dement, W.C., & Fuller, C.A. (1993). Effect of SCN lesions on sleep in squirrel monkeys: evidence for opponent processes in sleep-wake regulation. *Journal of Neuroscience*, 13, 1065-1079.

Gray, J. (1982). *The Neuropsychology of Anxiety*. Oxford, England: Clarendon Press.

Guan, Z., Peng, X., & Fang, J. (2004). Sleep deprivation impairs spatial memory and decreases extracellular signal-regulated kinase phosphorylation in the hippocampus. *Brain Research*, 1018, 38-47.

Holloway, F.A., & Wansley, R.A. (1973). Multiple retention deficits at periodic intervals after active and passive avoidance learning. *Behavioral Biology*, 9 (1), 1-14.

Hobson, J.A., Datta, S., Calvo, J.M., & Quattrochi, J. (1993). Acetylcholine as a brain state modulator: triggering and long term regulation of REM-sleep. *Progress in Brain Research*, 98, 389-404.

Hobson, J.A., Pace-Schott, E.F., & Stickgold, R. (2000). Dreaming and the brain: Toward a cognitive neuroscience of conscious states. *Behavior Brain Science*, 23 (6), 793-842.

Izquierdo, I., Medina, J.H., Vianna, M.R., Izquierdo, L.A., Barros, D.M. (1999). Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behavior Brain Research*, 103, 1-11.

Jewett, M.E., Wyatt, J.K., Ritz-de Cecco, A., Khalsa, S.B., Dijk, D.J., & Czeisler, C.A. (1999). Time course of sleep inertia dissipation in human performance and alertness. *Journal of Sleep Research*, 8, 1-8.

Karni, A., Tanne, D., Rubenstein, B.S., Askenasy, J.J., & Sagi, D. (1994). Dependence on REM sleep of overnight improvement of a perceptual skill. *Science*, 265 (5172), 679-682.

Machado, R.B., Hipólido, D.C., Benedito-Silva, A.A., & Tufik, S. (2004). Sleep deprivation induced by the modified multiple platform technique: quantification of sleep loss and recovery. *Brain Research*, 1004, 45-51.

Maquet, P., Laureys, S., Peigneux, P., Fuchs, S., Petiau, C., Phillips, C., Aerts, J., Del Fiore, G., Degueldre, C., Meulemans, T., Luxen, A., Franck, G., Van der



Linden, M., Smith, C., & Cleeremans, A. (2000). Experience-dependent changes in cerebral activation during human REM sleep. *Nature Neuroscience*, 3 (8), 831–836.

Maquet, P., Schwartz, S., Passingham, R., & Frith, C. (2003). Sleep-related consolidation of a visuomotor skill: brain mechanisms as assessed by functional magnetic resonance imaging. *Journal of Neuroscience*, 23 (4), 1432–1440.

McDermott, C.M., LaHoste, G.J., Chen, C., Musto, A., Bazan, N.G., & Magee, J.C. (2003). Sleep deprivation causes behavioral, synaptic and membrane excitability alterations in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 23 (29), 9687-9695.

Mendelson, W.B., Bergmann, B.M. & Tung, A. (2003). Baseline and post-deprivation recovery sleep in SCN-lesioned rats. *Brain Research*, 980, 185-190.

Méndez-Díaz, M., Irwin, L., Gómez-Chavarrín, M., Jiménez-Anguiano, A., Cabeza, R., Murillo-Rodríguez, E. & Prospéro-García, O. (2005). Cortistatin modulates memory evocation in rats. *European Journal of Pharmacology*, 507, 21-28.

Mistlberger, R.E., Bergmann, B.M., & Rechtschaffen, A. (1987). Relationship among wake episodes lengths, contiguous sleep lengths, and electroencephalographic delta waves in rats with suprachiasmatic nuclei lesions. *Sleep*, 10, 12-24.

Mistlberger, R.E., Bergmann, B.M., Waldenar, W., & Rechtschaffen, A. (1983). Recovery sleep following sleep deprivation in intact and suprachiasmatic nuclei-lesioned rats. *Sleep*, 6 (3), 217-233.

Moore, R.Y. (1992). The organization of the human circadian timing system. In D.F. Sarah, M.A. Hofman, M. Mirmira, R. Ravid & F.W. van Lécuwen (Eds.), *Progress in brain research* (Vol. 93, pp. 101-117). Elsevier Science Publishers.

Moore, R.Y. (2003). Circadian timing. In L.R. Squire, F.E. Bloom, S.K. McConnell, J.L. Roberts, N.C. Spitzer & M.J. Zigmond (Eds.), *Fundamental Neuroscience* (2<sup>a</sup> ed. pp. 1067-1084). California: Academic Press.

Moore, R.Y. & Lenn, N.J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 146 (1), 1-14.

Moreira, K.M., Hipólido, D.C., Nobrega, J.N., Bueno, O.F.A., Tufik, S., & Oliveira, M.G.M. (2003). Deficits in avoidance responding after paradoxical sleep deprivation are not associated with altered [<sup>3</sup>H]pirenzepine binding to M1 muscarinic receptors in rat brain. *Brain Research*, 977, 31-37.

O'Keef, J., & Nadel, L. (1978). *The hippocampus as a cognitive map*. London, England: Oxford University Press.

Peigneux, P., Laureys, S., Delbeuck, X., & Maquet, P. (2001). The role of sleep for memory systems. *Neuroreport*, 12 (18), A111–A124.

Poe, G.R., Nitz, D.A., McNaughton, B.L., & Barnes, C.A. (2000). Experience-dependent phase-reversal of hippocampal neuron firing during REM sleep. *Brain Research*, 855, 176–180.

Ralph M.R., Foster R.G., Davis F.C., & Menaker M. (1990). Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science*, 247 (4945), 975-978.

Siegel, J.M. (2001). The REM sleep-memory consolidation hypothesis. *Science*, 294, 1058–1063.

Sigworth, L.A., & Rea, M.A. (2003). Adenosine A1 receptors regulate the response of the mouse circadian clock to light. *Brain Research*, 960, 246-251.

Silva, R.H., Abílio, V.C., Takatsu, A.L., Kameda, S.R., Grassl, C., Chehin, A.B., Medrano, W.A., Calzavara, M.B., Registro, S., Andersen, M.L., Machado, R.B.,

Carvalho, R.C., Ribeiro, R.A., Tufik, S., & Frussa-Filho, R. (2003). Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology*, 46, 895-903.

Smith, C. (2001). Sleep states and memory processes in humans: procedural versus declarative memory systems. *Sleep Medicine Reviews*, 5 (6), 491–506.

Smith, C.T., Nixon, M.R., & Nader, R.S. (2004). Posttraining increases in REM sleep intensity implicate REM sleep in memory processing and provide a biological marker of learning potential. *Learning & Memory*, 11, 714-719.

Smith, C., & Smith, D. (2003). Ingestion of ethanol just prior to sleep onset impairs memory for procedural but not declarative tasks. *Sleep*, 26 (2), 185–191.

Stephan, F.K., & Kovacevic, N.S. (1978). Multiple retention deficit in passive avoidance in rats is eliminated by suprachiasmatic lesions. *Behavioral Biology*, 22 (4), 456-462.

Stickgold, R., James, L., & Hobson, J.A. (2000). Visual discrimination learning requires sleep after training. *Nature Neuroscience*, 3 (12), 1237-1238.

Stickgold, R., Scott, L., Rittenhouse, C., & Hobson, J.A. (1999). Sleep-induced changes in associative memory. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 11 (2), 182–193.

Suchecki, D., & Tufik, S. (2000). Social stability attenuates the stress in the modified multiple platform method for paradoxical sleep deprivation in the rat. *Physiology & Behavior*, 68, 309–316.

Timo-laria, C., Negrao, N., Schmidek, W.R., Hoshino, K., Lobato de Menezes, C.E., & Leme da Rocha, T. (1970). Phases and states of sleep in the rat. *Physiology & Behavior*, 5 (9), 1057-1062.

Van Dongen, H.P.A., & Dinges, D.F. (2000). Circadian Rhythms in Fatigue, Alertness and Performance. In M.G. Kryger, T. Roth & W. C. Dement (Eds.), *Principles and Practice of Sleep Medicine* (3<sup>rd</sup> ed., pp. 391-399) Philadelphia: WB Saunders.

Vertes, R.P. (2004). Memory consolidation in sleep; dream or reality. *Neuron*, 44 (1), 135-148.

Wagner, U., Gais, S., & Born, J. (2001). Emotional memory formation is enhanced across sleep intervals with high amounts of rapid eye movement sleep. *Learning and Memory*, 8, 112–119.

Wagner, U., Gais, S., Haider, H., Verleger, R., & Born, J. (2004). Sleep inspires insight. *Nature*, 427 (6972), 352-355.

Walker, M.P., & Stickgold, R. (2004). Sleep-dependent learning and memory consolidation. *Neuron*, 44, 121-133.

Walker, M.P., & Stickgold, R. (2006). Sleep, memory and plasticity. *Annual Reviews in Psychology*, 57, 12.1-12.28.

Wright Jr., K.P., Hull, J.T., Hughes, R.J., Ronda, J.M., & Czeisler, C.A. (2006). Sleep and wakefulness out of phase with internal biological time impairs learning in humans. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 18 (4), 508-521.

Wurts, S.W., & Edgar, D.M. (2000). Circadian and homeostatic control of rapid eye movement (REM) sleep: promotion of REM tendency by the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience*, 20 (11), 4300-4310.

Yamada, K., & Iwasaki, T. (1994). Diurnal-variation in passive-avoidance response and serum corticosterone in rats. *Japanese Journal of Psychology*, 65 (3), 173-180.

Youngblood, B.D., Zhou, J., Smagin, G.N., Ryan, D.H. & Harris, R.B.S. (1997). Sleep deprivation by the “flower pot” technique and spatial reference memory. *Physiology & Behavior*, 61 (2), 249-256.

Yoo, S.S., Hu, P.T., Gujar, N., Jolesz, F.A., & Walker, M.P. (2007). A deficit in the ability to form new human memories without sleep. *Nature Neuroscience*, 10 (3), 385-392.